

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA

RAFAEL FREDERICO FONSECA

Dinâmica, Otimização e Controle de Processos de
Fermentação em Estado Sólido: Desenvolvimento de
Metodologias em Escala Laboratorial.

SÃO CARLOS – SP

2016

Rafael Frederico Fonseca

**DINÂMICA, OTIMIZAÇÃO E CONTROLE DE
PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO: DESENVOLVIMENTO DE
METODOLOGIAS EM ESCALA
LABORATORIAL**

Tese de apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador: Professor Dr. Wu Hong Kwong

SÃO CARLOS – SP

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

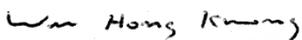
F676d Fonseca, Rafael Frederico
Dinâmica, otimização e controle de processos de
fermentação em estado sólido : desenvolvimento de
metodologias em escala laboratorial / Rafael
Frederico Fonseca. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
162 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

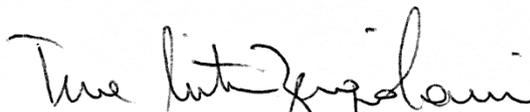
1. Fermentação em estado sólido. 2. Controle
proporcional integrativo. 3. Controle preditivo. 4.
Modelagem matemática. 5. Otimização do processo. I.
Título.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE RAFAEL
FREDERICO FONSECA APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM
04 DE MAIO DE 2016.

BANCA EXAMINADORA:


Wu Hong Kwong
Orientador, UFSCar


Ronaldo Guimarães Corrêa
UFSCar


Teresa Cristina Zangirolami
UFSCar


Nivaldo Aparecido Corrêa
USP


Paulo Estevão Cruvinel
EMBRAPA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que fizeram parte desse período de doutorado, na forma em que tenham participado. São eles a minha família, pai, mãe, avós, irmãs, primos, tios e tias, e amigos que sempre estiveram por perto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Wu Hong Kwong por todo apoio na execução desse trabalho, assim como aos pesquisadores Victor Bertucci Neto e Cristiane Sanchez Farinas, da Embrapa Instrumentação, pelo suporte ao longo desses anos.

Agradeço também aos técnicos da oficina mecânica da Embrapa, Jorge Luiz Novi e Luiz Aparecido de Godoy por todo auxílio no desenvolvimento do biorreator construído, sem o qual esse trabalho não teria sido finalizado. Agradeço também a Silviane Zanni Hubinger pelo suporte oferecido ao bom andamento das atividades no Laboratório de Agroenergia da Embrapa Instrumentação, onde esse trabalho foi desenvolvido.

Agradeço aos estagiários Caio Borba de Melo e Beatriz Cristina Pecoraro Sanches que foram as responsáveis pela realização das fermentações e análises enzimática planejadas nesse trabalho. Agradeço a todos no Laboratório por tudo o que foi discutido, conversado e aprendido nesse tempo.

Agradeço à Embrapa Instrumentação e ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos pelo suporte ao desenvolvimento da pesquisa realizada.

Agradeço à CAPES pela bolsa disponibilizada a fim de que pudesse superar mais essa fase da vida.

RESUMO

Uma das características da fermentação em estado sólido é que ela ocorre na ausência de água livre. Isso a torna vantajosa por simular o ambiente natural dos microrganismos com possibilidade de uso de resíduos agroindustriais in natura. Por outro lado, dificulta a transferência de calor entre os elementos do processo e, com isso, a capacidade de controlar a temperatura do meio fica debilitada. Por sua vez, a dinâmica do crescimento microbiano e a formação de produtos de interesse estão diretamente relacionadas às condições ambientais, cujas variações podem ser prejudiciais à produtividade do processo. Ao mesmo tempo, o calor gerado pelo metabolismo microbiano aumenta a temperatura do processo, que necessita ser regulada. Estudos que revelam como os microrganismos se comportam frente essas variações são escassos. Além disso, não foram encontradas leis de controle para a FES, com garantia de estabilidade, a fim de se minimizar os efeitos dos distúrbios. Duas frentes se destacam para a viabilização da FES: o desenvolvimento de um modelo matemático capaz de estimar os efeitos das variações das condições ambientais na dinâmica do processo e um sistema de controle da temperatura apropriado para lidar com os distúrbios gerados pelo crescimento celular. Em conjunto com a modelagem matemática, foram empregados mecanismos computacionais para averiguar qual seria o perfil de temperaturas que mais favorece à formação dos produtos. Por sua vez, foram estudados dois tipos de controladores: os proporcionais integrativos, pela ampla aplicação industrial, e os preditivos baseados em modelo, pela versatilidade no controle multivariável. Os sistemas de controle foram testados em um biorreator de 11 litros de volume nominal. Dentre várias, algumas metodologias para ajuste dos controladores proporcionais integrativos foram avaliadas nos quesitos desempenho e estabilidade relativa durante a fase de simulações. A metodologia que se provou estável nos testes realizados foi implementada no biorreator. Já para o controlador preditivo, frente às incertezas do processo fermentativo, foi necessário desenvolver um mecanismo de auto ajuste do modelo desenvolvido, a fim de que os erros dos estados não estimados do processo real fossem compensados e o controlador tivesse um desempenho adequado. Os resultados mostraram que o microrganismo, *Aspergillus niger* 3T5B8, produz uma quantidade maior de metabólitos de interesse a uma temperatura constante de 32°C. Além disso, ambos controladores utilizados apresentaram resultados apropriados aos requisitos do processo fermentativo, ou seja, com desvio médio da temperatura de referência menor do que 0,6°C.

Palavras chave: fermentação em estado sólido, controle proporcional integrativo, controle preditivo, modelagem matemática, otimização do processo.

ABSTRACT

Solid-state fermentation is characterized by the growth of microorganisms in absence of free water. In one hand, it is advantageous because simulates their natural environment, enabling the use of agro industrial residues *in natura*. On the other hand, it limits heat transfer between elements, restricting control over the temperature of the medium. In fact, the microbial growth and the product formation dynamics are directly affected by the environmental conditions and variations can be harmful to the process productivity. As a consequence, the temperature increase caused by metabolic heat needs to be avoided. Studies concerning the microbial dynamics dealing with these variations are scarce. Moreover, it was not found any control laws, with guarantee of stability, which was designed for a reference tracking and to minimize the disturbances effects. Thus, two fronts need to be addressed for the solid-state fermentation viability: the development of a mathematical model able to estimate the effects of environmental changes in the process; and a temperature control system able to handle the heat from microbial metabolism. The model was used in a computational algorithm in order to determine if there was a temperature profile that would be more favorable to the products formation. In this work two control laws were studied, a proportional integrative, because it is the most widespread in the industry, and a model base predictive controller, because of its multivariable control versatility. Both control laws were simulated and then implemented in an eleven liters agitated drum bioreactor. Some of the various methods for PI controller parameters settings had their performance and relative stability requirement evaluated. The one that was proved stable was implemented in the bioreactor. Due to the uncertainties of the fermentation process, a self-adjustment mechanism was added to the predictive controller, in spite of the developed mathematical model, in order to avoid some estimation mistakes caused by some non-estimated states of the real process. The controller achieved an adequate performance with this approach. The results showed that the microorganisms were more efficient at a constant 32°C temperature. In addition, both developed controllers presented appropriate results facing the fermentation process requirement, with mean deviances from the referential temperature below 0,6°C and a maximum error of 2,8°C.

Keywords: solid state fermentation, proportional integrative control, predictive control, mathematical modeling, process optimization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Biorreator do tipo colunas aeradas. As setas indicam a direção do fluxo de ar.	32
Figura 1.2: Tambor rotativo utilizado nos estudos de Lindenfelser e Ciegler (1975).	32
Figura 1.3: Tambor rotativo utilizado por Nagel <i>et al</i> (2001).....	33
Figura 1.4: Planta piloto de um biorreator de leito mixado.	33
Figura 1.5: Biorreator do tipo Koji.	34
Figura 1.6: Perfil de crescimento das Equações: Linear, Logística, Exponencial e Duas Fases.	38
Figura 1.7: Resultado obtido com o resfriamento evaporativo.	44
Figura 1.8: Resposta de controle obtida pelo sistema.	44
Figura 1.9: Temperatura no leito do biorreator em diferentes alturas.	45
Figura 1.10: Diagrama genérico de um controlador PID.	46
Figura 1.11: conceituação básica de um controle preditivo.	47
Figura 1.12: Esquema geral de um controlador MPC com realimentação de saída.	48
Figura 1.13: Diagrama de experimento de um planejamento composto central rotacional.	50
Figura 1.14: Exemplo de uma operação evolucionária em três passos para dois fatores..	51
Figura 2.1: Biorreator de tambor agitado horizontal.....	62
Figura 2.2: Tambor de fermentação.	62
Figura 2.3: Cuba para controle da temperatura do processo.	63
Figura 2.4: Tampas do tambor de fermentação.	64
Figura 2.5: Bases laterais para suporte do tambor de fermentação.	65
Figura 2.6: Primeira versão das pás agitadoras.....	66
Figura 2.7: Segunda versão das pás agitadoras.....	67
Figura 2.8: Terceira versão das pás agitadoras.	68
Figura 2.9: Última versão das pás agitadoras.	68
Figura 2.10: Redução sem fim.....	70
Figura 2.11: Montagem do sistema de aquecimento do biorreator.	71
Figura 2.12: Fluxograma do programa que automatiza o biorreator.	76
Figura 2.13: Painel frontal do programa que opera o biorreator.	79
Figura 2.14: Inicialização dos instrumentos e saída via Labview.	80
Figura 2.15: Chamada de um <i>subVI</i> (<i>virtual instrument</i>) para operacionalizar a sonda.	81
Figura 2.16: <i>SubVI</i> (<i>virtual instrument</i>) que operacionaliza a sonda.	82
Figura 2.17: SubVI de um controlador PI no Labview.	83
Figura 2.18: Instrumento virtual que roda o controlador preditivo.	83
Figura 3.1: Evolução e variabilidade do crescimento microbiano.	102
Figura 3.2: Evolução da produção de endoglucanase e do crescimento microbiano.....	107
Figura 3.3: Perfis de temperatura calculados pelo algoritmo de otimização.	108

Figura 3.4: Evolução da produção de endoglucanase e do crescimento microbiano para experimentos com período de 42 horas.....	109
Figura 4.1: Resposta simulada dos controladores para dois tipos de entrada.	124
Figura 4.2: Diagrama genérico de um controlador preditivo baseado em modelo.	128
Figura 4.3: Analogia de uma estimador de estados linear com realimentação de saída.	131
Figura 4.4: Temperatura do processo controlado por um controlador preditivo com desvio nas estimações.	130
Figura 4.5: Resultado experimental do controle da temperatura do meio fermentativo.	134
Figura 4.6: Ações de controle dos controladores Proporcional-Integrativo (PI) e Preditivo (Prd).	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Vantagens e desvantagens da FES em relação à FS.....	29
Tabela 1.2: Forma diferencial dos principais modelos de crescimento usados em FES (Mitchell <i>et al.</i> , 2006).....	37
Tabela 1.3: Valores típicos dos parâmetros de produção de calor, gases e água e consumo de substrato.	39
Tabela 1.4: Lista de experimentos em um planejamento fatorial de 3 fatores.	50
Tabela 3.1: Experimentos realizados.....	93
Tabela 3.2: Cinética da formação de Xilanase e Endoglucanase.	103
Tabela 3.3: Parâmetros do modelo de crescimento microbiano para cada condição experimental.	104
Tabela 3.4: Parâmetros do modelo de formação de produtos para cada condição experimental.	105
Tabela 4.1: Regras para ajustes dos parâmetros de um controlador PI	122
Tabela 4.2: Resultado do ajuste dos parâmetros para diferentes metodologias.....	123
Tabela 4.3: Faixa calculada para a margem de ganho e para os indicadores de estabilidade para as metodologias avaliadas, considerando-se a variação do ganho e da constante de tempo do processo.	127

Nomenclatura por Capítulo

Capítulo 1

Q_i	Parcela de transferência de calor	J/h
Q_{cond}	Parcela de transferência de calor por condução térmica	J/h
Q_{conv}	Parcela de transferência de calor por convecção térmica	J/h
Q_{evap}	Parcela de transferência de calor evaporação da água	J/h
r_Q	Calor gerado pela atividade microbiana	J/h
$\frac{dT_{meio}}{dt}$	Velocidade de variação média da temperatura do meio fermentativo	$^{\circ}C/h$
$\frac{dM_a}{dt}$	Velocidade de variação da massa de água	kg_w/h
r_{evap}	Velocidade de evaporação da água	kg_w/h
m_{meio}	Massa do meio fermentativo	kg_S
$C_{P_{meio}}$	Calor específico do meio fermentativo	$\frac{J}{kg_S K}$
A_{ij}	Superfície de contato entre as superfícies i e j	m^2
k_{ij}	Coeficiente de condução térmica entre as superfícies i e j	$\frac{J}{m^2 h K}$
T_i	Temperatura de uma superfície	$^{\circ}C$
h_{ij}	Coeficiente de convecção térmica entre as superfícies i e j	$\frac{J}{mhK}$
y_g	Pressão de vapor de água da fase gasosa	Atm ou mmHg
y_L	Pressão de vapor de água da camada limite	Atm ou mmHg
H_V	Calor latente de vaporização da água	$2400kJ/kg_w$

k_w	Taxa de transferência superficial de massa de água	$\frac{kg_w}{m^2h}$
R_i	Mecanismos de transporte de água	$\frac{kg_w}{m^2h}$
r_a	Produção metabólica de água	$\frac{kg_w}{kg_Xh}$
UIS	Umidade inicial do substrato	$\frac{kg_w}{kg_w + kg_S}$
n	Constante da equação logística	-
$\frac{dP}{dt}$	Velocidade de formação dos produtos de interesse	U/kg_S
$\frac{dX}{dt}$	Velocidade de variação da biomassa	kg_X/h
k	Velocidade de crescimento de biomassa	$\frac{kg}{h}$
μ_M	Crescimento específico	h^{-1}
X_M	Máxima biomassa por massa de substrato	kg_X/kg_S
X	Biomassa por massa de substrato	kg_X/kg_S
K_D	Constante de desaceleração do crescimento microbiano	h^{-1}
κ	Velocidade de desaceleração da equação de desaceleração	h^{-1}
t_a	Tempo em que começa a segunda fase de crescimento microbiano	h
t	Tempo do processo	h
r_S	Consumo de substrato pela atividade microbiana	kg_S/h
r_{CO_2}	Velocidade de formação de CO ₂ pela respiração microbiana	$\frac{mmol}{kg_Sh}$

Y_{QX}	Coeficiente de geração de calor por biomassa para crescimento celular	J/kg_X
m_Q	Coeficiente de geração de calor por biomassa para manutenção celular	$J/kg_X h$
Y_{wX}	Coeficiente de produção de água por biomassa para crescimento celular	kg_w/kg_X
m_w	Coeficiente de produção de água por biomassa para manutenção celular	$kg_w/kg_X h$
Y_{SX}	Coeficiente de consumo de substrato por biomassa para crescimento celular	kg_S/kg_X
m_S	Coeficiente de consumo de substrato por biomassa para manutenção celular	$kg_S/kg_X h$
Y_{CO_2X}	Coeficiente de produção de CO ₂ por biomassa e substrato para crescimento celular	$\frac{mmol}{kg_X kg_S}$
m_{CO_2}	Coeficiente de produção de CO ₂ por biomassa e substrato para manutenção celular	$\frac{mmol}{kg_X kg_S h}$
Y_{PX}	Coeficiente de formação de produtos por massa seca de substrato para crescimento celular	$\frac{U}{kg_S}$
m_P	Coeficiente de formação de produtos por massa seca de substrato não associado ao crescimento celular	$\frac{U}{kg_S h}$
k_D	Velocidade de degradação dos produtos	h^{-1}
$G_c(t)$	Equação do controlador PID no tempo	Depende da entrada e da saída
$G_c(s)$	Função de transferência do controlador PID	Depende da entrada e da saída

$G_p(s)$	Função de transferência do processo	Depende da entrada e da saída
K_c	Ganho proporcional do controlador PID	Depende da entrada e da saída
T_i	Tempo integral	h
T_d	Tempo derivativo	h
$y(t)$	Saída do processo	$^{\circ}C, RPM, L/min$
r_f	Entrada de referência do processo	Depende do que está sendo controlado
R	Horizonte de previsão do controlador preditivo	
L	Horizonte de controle do controlador preditivo	
A_{MPC}	Dinâmica do modelo utilizado pelo controlador preditivo	
S_{MPC}	Matriz dinâmica	
J_u	Função objetivo do controlador preditivo	
$\hat{E}^{\circ}(n)$	Erro entre a saída prevista e a referência do controlador preditivo	
$\hat{Y}^{\circ}(n)$	Valor da saída não forçada prevista pela matriz dinâmica	
$\hat{b}(n)$	Erro entre o valor da saída e o valor previsto pela matriz dinâmica no instante n	
$\Delta u(n)$	Próximas ações do controlador preditivo	

Capítulo 3

μ	Crescimento específico	h^{-1}
$X_{M_{1,2}}$	Máxima biomassa por massa de substrato para as respectivas fases de crescimento	kg_X/kg_S
k_d	Velocidade de morte/inativação celular	h^{-1}
$X_{v_{1,2}}$	Biomassa viável para as respectivas fases de crescimento	kg_X
$X_{v_{1,2}}$	Biomassa total para as respectivas fases de crescimento	kg_X
η	Velocidade de acomodação da biomassa ao substrato	h^{-1}
t_a	Tempo em que começa a segunda fase de crescimento microbiano	h
$Y_{X_{End}}$	Coefficiente de formação de endoglucanase por biomassa e massa seca de substrato associado ao crescimento celular	$\frac{U_{End}}{kg_X kg_S}$
m_{End}	Coefficiente de formação de endoglucanase por biomassa e massa seca de substrato não associado ao crescimento celular	$\frac{U_{End}}{kg_X kg_S h}$
$Y_{X_{xil}}$	Coefficiente de formação de xilanase por biomassa e massa seca de substrato associado ao crescimento celular	$\frac{U_{xil}}{kg_X kg_S}$
m_{xil}	Coefficiente de formação de endoglucanase por biomassa e massa seca de substrato não associado ao crescimento celular	$\frac{U_{xil}}{kg_X kg_S h}$
$k_{D_{End}}$	Velocidade de degradação da endoglucanase por massa seca de substrato	$\frac{U_{End}}{kg_S h}$
$k_{D_{xyl}}$	Velocidade de degradação da xilanase por massa seca de substrato	$\frac{U_{xil}}{kg_S h}$
$\frac{dX_{v_{1,2}}}{dt}$	Velocidade de alteração da biomassa viável para as respectivas fases de crescimento	$\frac{kg}{h}$
$\frac{dX_{T_{1,2}}}{dt}$	Velocidade de alteração da biomassa total para as respectivas fases de crescimento	$\frac{kg}{h}$

$\frac{dF_{1,2}}{dt}$	Velocidade de adaptação celular ao meio fermentativo	-
$\frac{dE_{nd}}{dt}$	Velocidade de formação de endoglucanase por massa seca de substrato	$\frac{U_{End}}{kg_s h}$
$\frac{dX_{il}}{dt}$	Velocidade de formação de xilanase por massa seca de substrato	$\frac{U_{Xil}}{kg_s h}$
r_{CO_2}	Velocidade de formação de CO ₂ pela respiração microbiana	$\frac{mmol}{g_s h}$

Capítulo 4

Cp_g	Calor específico do ar	$1006 \frac{J}{kgK}$
Cp_h	Calor específico do vapor de água	$1900 \frac{J}{kgK}$
Cp_b	Calor específico do aço inox	$500 \frac{J}{kgK}$
Cp_c	Calor específico do policarbonato	$1200 \frac{J}{kgK}$
Cp_w	Calor específico da água	$4182 \frac{J}{kgK}$
Cp_m	Calor específico do mármore	$858 \frac{J}{kgK}$
Cp_s	Calor específico do farelo de trigo	$440 \frac{J}{kgK}$
ρ	Densidade do material	$\frac{kg}{m^3}$
G_c	Massa de ar da cuba	kg
G_b	Massa de ar na fase gasosa do biorreator	kg
M_c	Massa de policarbonato da cuba	kg

M_b	Massa de aço do biorreator	kg
M_a	Massa de água no substrato	kg
M_m	Massa de mármore da mesa	kg
M_S	Massa de substrato	kg
F_{in}	Fluxo de ar que alimenta o biorreator	L/h
h_{oe}	Convecção térmica entre a parede da cuba e o ar exterior	$\frac{J}{m^2Kh}$
h_{sa}	Convecção térmica entre o substrato e o ar	$\frac{J}{m^2Kh}$
h_{so}	Convecção térmica entre o substrato e o ar da cuba	$\frac{J}{m^2Kh}$
A_{oe}	Área de contato entre a parede da cuba e o ar exterior	m^2
A_{sa}	Área de contato entre o substrato e o ar	m^2
A_{so}	Área de contato entre o substrato e o ar da cuba	m^2
Q_{CO_2}	Calor gerado pela atividade microbiana	J/h
X_{gi}	Fração mássica de vapor d'água	-
X_{ga}	Fração mássica de vapor d'água	-
X_{go}	Fração mássica de vapor d'água	-
H_V	Calor latente de vaporização da água	$2400kJ$ $/kg_w$
UIS	Umidade inicial do substrato	$\frac{kg_a}{kg_a + kg_s}$
Q_P	Calor trocado para o aquecimento/refrigeração da cuba	J/h
Q_0	Calor residual gerado pelos equipamentos no interior da cuba	J/h

T_{ext}	Temperatura do ambiente externo da cuba	$^{\circ}C$
T_o	Temperatura média interna da cuba	$^{\circ}C$
$\frac{dT_m}{dt}$	Velocidade de variação média da temperatura do substrato	$^{\circ}C/h$
$\frac{dT_a}{dt}$	Velocidade de variação média da temperatura do ar da fase gasosa do biorreator	$^{\circ}C/h$
$\frac{dT_o}{dt}$	Velocidade de variação média da temperatura do ar da cuba	$^{\circ}C/h$
$\frac{dT_{in}}{dt}$	Velocidade de variação média da temperatura do ar que alimenta o biorreator	$^{\circ}C/h$
S	Matriz dinâmica	
J_u	Função objetivo do controlador preditivo	
$\hat{E}^{\circ}(n)$	Vetor coluna que define o erro entre a saída prevista e a referência do controlador preditivo	
$\tilde{Y}^{\circ}(n)$	Vetor coluna que guarda o valor da saída não forçada prevista pela matriz dinâmica	
$r_f(n)$	Vetor coluna que guarda o valor da referência de temperatura do processo	
f	Fator de ponderação da amplitude das ações de controle	
$\hat{e}(k)$	Erro entre a referência e o valor da temperatura média do meio fermentativo	
$\Delta u(n)$	Vetor das próximas ações do controlador preditivo	
I	Matriz identidade	
A	Matriz de estados de um sistema linear qualquer	

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	5
AGRADECIMENTOS	7
RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS.....	15
NOMENCLATURA.....	17
SUMÁRIO	25
1. FUNDAMENTOS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	27
1.1. INTRODUÇÃO	27
1.1.1. Processos Fermentativos	28
1.2. BIORREATORES DE FES	30
1.2.1. Biorreatores Típicos.....	31
1.3. MODELAGEM MATEMÁTICA DE BIORREATORES E PROCESSOS DE FES	34
1.3.1. Transferência de Calor	35
1.3.2. Transferências de Massa.....	36
1.3.3. Cinética do Crescimento Microbiano	37
1.3.4. Efeitos do Crescimento Microbiano	38
1.4. INSTRUMENTAÇÃO E CONTROLE DE BIORREATORES DE FES.....	40
1.4.1. Instrumentação	40
1.4.2. Controle dos Processos.....	43
1.4.2.1. Controladores Liga/Desliga	43
1.4.2.2. Controladores PID	45
1.4.2.3. Controle Baseado em Previsão por Modelo.....	46
1.5. OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS DE FES	49
1.5.1. Planejamentos Fatoriais e Metodologia da Superfície de Resposta	49
1.5.2. Operações Evolucionárias.....	51
1.5.3. Modelagem Matemática.....	51
1.5.4. Programação Dinâmica Iterativa	52
1.6. OBJETIVOS DA TESE	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
2. DESENVOLVIMENTO, CONSTRUÇÃO, AUTOMAÇÃO E INSTRUMENTAÇÃO DE	59
UM BIORREATOR DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	59
2.1. INTRODUÇÃO	59
2.2. METODOLOGIA.....	60
2.2.1. Desenho Mecânico do Biorreator	61
2.2.2. Agitação do processo	65
2.2.2.1. Pás Agitadoras	65
2.2.2.2. Controle da Agitação.....	69
2.2.2.3. Aeração do processo.....	70
2.2.3. Controle da temperatura da parede externa do biorreator.....	71
2.2.4. Sonda de temperatura.....	72
2.2.5. Fotografias do biorreator.....	72
2.3. INSTRUMENTAÇÃO VIRTUAL PARA AUTOMAÇÃO DO BIORREATOR	75
2.4. DISCUSSÕES	85
2.5. CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
3. MODELAGEM DE UM PROCESSO DE FES EM AMPLA FAIXA OPERACIONAL	89
COM APLICAÇÃO NA OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO.....	89
3.1. INTRODUÇÃO	89
3.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	91
3.2.1. Fermentação em estado sólido	91
3.2.2. Análise Respirométrica	91
3.2.3. Extração das Enzimas.....	92
3.2.4. Análise das Atividades Enzimáticas	92

3.2.5. Planejamento Experimental	92
3.3. MODELAGEM MATEMÁTICA	94
3.3.1. Modelo Proposto	94
3.3.2. Ajuste e Interpolação dos Parâmetros	97
3.4. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO	99
3.4.1. Condição Ótima via Modelagem Matemática.....	99
3.4.2. Algoritmo Iterativo	99
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	101
3.5.1. Ajuste do Modelo	103
3.5.1.1. Evolução do Crescimento Microbiano e da Produção Enzimática.....	106
3.5.2. Otimização e Aprimoramentos do Modelo	108
3.6. CONCLUSÕES.....	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
4. CONTROLE DE UM PROCESSO DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO: UMA ANÁLISE DO DESEMPENHO ENTRE DIFERENTES METODOS.	115
4.1. INTRODUÇÃO	115
4.2. PROCESSO DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	117
4.3. MODELO MATEMÁTICO DO BIORREATOR.....	118
4.3.1. Modelo Matemático do Processo Fermentativo	120
4.4. ESTRATÉGIAS DE CONTROLE.....	121
4.4.1. Ajuste dos Parâmetros do Controlador PI.....	122
4.4.1.1. Critérios para Escolha dos Parâmetros	123
4.4.2. Controlador Preditivo Baseado em Modelo.....	127
4.4.3. Controlador Preditivo com Estimador Auto Ajustável	130
4.5. RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO	133
4.6. CONCLUSÃO.....	136
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	138
5. CONCLUSÕES DA TESE	145
5.1. TRABALHOS FUTUROS	146
5.2. CONSIDERAÇÕES PESSOAIS	149
APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR DA MODELAGEM DO PROCESSO	151
APÊNDICE B – MATERIAL SUPLEMENTAR DO CONTROLE DO PROCESSO.....	157

1. FUNDAMENTOS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

1.1. INTRODUÇÃO

Os processos fermentativos vêm sendo utilizados a milênios pelos seres humanos. A fabricação de pães, vinho, queijos e outros laticínios e cerveja são exemplos do uso desses processos. Basicamente, seus objetivos eram a transformação de características e propriedades de alimentos, visando muitas vezes um prolongamento da sua vida útil. Apesar do largo período de conhecimento sobre esses processos, somente a partir do século XIX é que os microrganismos responsáveis passaram a ser conhecidos. Ainda, somente durante a segunda guerra mundial é que começaram a ser utilizados em escala industrial, por causa da demanda por antibióticos nas frentes de batalhas (Najafpour, 2007).

Os processos fermentativos podem ser divididos em dois grupos básicos: a Fermentação Submersa (FS), a qual ocorre em meio líquido, e a Fermentação em Estado Sólido (FES), que é caracterizada pela ausência de água livre. Durante e após a segunda guerra mundial a FS foi largamente desenvolvida principalmente devido às facilidades de controle das variáveis internas do biorreator quando comparada com a FES. A temperatura do meio, o pH, a agitação e aeração são mais simples de serem controladas por estarem em meio líquido. Por sua vez, a FES, na qual o meio fermentativo é sólido e heterogêneo, foi preterida justamente pelas dificuldades de transferência de calor e massa inerentes à ampliação da escala (Schaechter, 2004).

Se o objetivo desses processos for a produção de enzimas celulolíticas, a FES apresenta algumas vantagens em relação à FS, sendo as mais relevantes uma maior produção de enzimas por unidade volume fermentado, maior estabilidade térmica e menor susceptibilidade à problemas de inibição por substrato (Holker *et al.*, 2004). Além disso, resíduos agroindustriais como o bagaço de cana podem ser utilizados como substratos para tais fermentações, servindo como fonte de carbono e energia.

Nesse trabalho os principais objetivos são: aprofundar o conhecimento da produção de celulases, utilizando um planejamento central rotacional para modelar o processo em diversas condições ambientais; controlar um biorreator do tipo tambor rotativo comparando-se algumas

técnicas de ajuste para rejeição de distúrbio e, por fim, otimizar uma batelada controlando as condições ambientais em tempo real.

1.1.1. Processos Fermentativos

Desde a Segunda Guerra Mundial a FS vem sendo o principal tipo de processo utilizado para produção de vários produtos devido às facilidades de controle das variáveis internas do biorreator (Carlile *et al.*, 2001). Muitos foram os avanços técnicos desenvolvidos para as aplicações industriais da FS, que podem ser encontrados nos mais diversos processos de produção de fármacos, enzimas, pigmentos, aromatizantes, dentre outros. No entanto, o ambiente de crescimento natural da grande maioria dos microrganismos se dá em meios sólidos. Considerando-se os fungos, apenas 1% de das espécies conhecidas são adaptadas para ambientes aquáticos, ainda que a evolução dessas tenha se dado em ambientes terrestres. Consequentemente, o cultivo desses em ambientes líquidos pode afetar seu, assim como os metabólitos produzidos (Holker *et al.*, 2004).

O trabalho desenvolvido nessa tese está inserido no contexto da produção de etanol de segunda geração através da rota enzimática, sendo que o principal objetivo é contribuir no desenvolvimento do processo da produção das enzimas celulolíticas. A rota enzimática tem sido preferida no desenvolvimento das atuais plantas de etanol celulósico, principalmente devido aos custos financeiros, técnicos e ambientais quando comparados à hidrólise ácida. Por hidrólise, deve-se entender a quebra das longas cadeias de açúcares presentes na celulose, principalmente proveniente do bagaço da cana de açúcar, palhas e madeira, em açúcares apropriados para a fermentação alcoólica, ligada ao etanol de primeira geração (Pirota *et al.*, 2013)

Ao se comparar a produção de enzimas celulolíticas (CMCase, FPase e Betaglucosidade) produzidas por FES e FS, encontra-se na literatura que a primeira é capaz de produzir mais do que 50 vezes o montante de enzimas da FS por volume de meio, assim como produzir outros metabólitos não secretados na FS (Li *et al.*, 2013). Além disso, a FES gera uma quantidade menor de efluentes líquidos e possui menores custos de processo. Apesar de apresentar algumas vantagens competitivas com relação à FS, a utilização da FES em uma escala viável industrialmente não foi possível principalmente devido a dificuldades na remoção do calor produzido pela atividade microbiana (El-Bakry *et al.*, 2015). Também são encontradas

dificuldades na agitação do substrato, gradientes de pH e atividade de água. A Tabela 1 mostra uma compilação das principais vantagens e desvantagens da FES em relação à FS (Holker *et al.*, 2004).

Tabela 1.1: Vantagens e desvantagens da FES em relação à FS.

Fator	FES	FS
Substrato	Barato, pode ser utilizado quase qualquer fonte de celulose como substrato, em geral resíduos agroindustriais.	Caro.
Condições de assepsia	Não necessárias, mas depende do microrganismo sendo cultivados, quanto maior o período para crescimento melhores deverão ser as condições de assepsia.	Essenciais, em geral as contaminações são ocasionadas por bactérias de rápido crescimento.
Umidade do meio	Ausência de água livre, conseqüentemente menor desperdício.	Meio líquido
Produção enzimática	Alta	Baixa
Agitação	Difícil, para cada processo desenvolvido uma nova solução em agitação deve ser trabalhada devido às particularidades de cada substrato e também da sensibilidade do microrganismo à ruptura das hifas.	Fácil, por se tratar de um meio líquido.
Controle do processo (Temperatura e pH)	Difícil, as transferências de calor e massa são limitadas devido à ausência de água livre;	Fácil, por se tratar de um meio líquido agitado, em geral o mesmo é considerado homogêneo.
Aumento de escala	Muito difícil, principalmente por causa das dificuldades de controle do processo, sendo necessário o desenvolvimento de um desenho de biorreator novo para cada novo processo.	Fácil, equipamentos industriais são vendidos comercialmente.
Volume do biorreator	Biorreatores menores devido à maior produtividade por volume fermentado.	Biorreatores maiores devido à menor produtividade por volume fermentado.

As informações da Tabela 1 mostram que as maiores necessidades da FES são um sistema de controle capaz de lidar com os distúrbios gerados pelo crescimento microbiano,

aliados a um bom conhecimento do processo e ao desenvolvimento de soluções específicas para cada tipo de biorreator escolhido para processos específicos. As seções 1.2 a 1.5 trazem maiores informações a respeito do que já foi realizado e que é relativo ao processo desenvolvido nesse trabalho.

1.2. BIORREATORES DE FES

A FES é subordinada à diversos fatores, dentre eles, a seleção de microrganismos e substratos e suas relações físico-químicas; a transferências de calor e a massa no interior dos biorreatores, que por consequência definem o desenho e geometria dos mesmos. Nesse contexto, diversos tipos de biorreatores foram desenvolvidos, cada um considerando as características ambientais favoráveis ao desenvolvimento dos microrganismos e a produtividade dos metabólitos de interesse (Thomas *et al.*, 2013).

Os biorreatores mais comumente encontrados na literatura são classificados principalmente com respeito à agitação do meio e o tipo de aeração utilizados, sendo divididos em agitados, não agitados e intermitentes e com aeração forçada ou não forçada. Também são divididos quanto ao volume útil dos mesmos, sendo considerados em escala de bancada, escala piloto e biorreatores industriais, variando-se o volume de alguns gramas para toneladas entre essas escalas. Para qualquer combinação de agitação/aeração com a geometria do biorreator, a sensibilidade do microrganismo à agitação e às variações de temperatura no interior do substrato são fatores fundamentais durante o seu desenvolvimento (Mitchell *et al.*, 2006).

A remoção de calor durante os processos de FES tem sido feita tipicamente através da condução térmica das paredes ou do resfriamento por evaporação de água, dependendo do tipo do biorreator (Durand, 2003). Mais recentemente, métodos de variação de pressão no interior dos biorreatores têm sido empregados com sucesso, acrescenta-se ainda que esse tipo de resfriamento pode ser aplicado tanto em sistema agitados quanto de leito fixo (He e Chen, 2013).

Significativas melhorias no entendimento de como projetar, operar e escalonar processos de FES tem como base a aplicação de técnicas de modelagem para descrever os fenômenos biológicos e de transporte no sistema (Mitchell *et al.*, 2006) (Stuart *et al.*, 1999) (Stuart e Mitchell, 2003). Na maioria das vezes, os estudos de caracterização desses processos

são feitos com base nas propostas de biorreatores já existentes, tais como: os de coluna, bandeja, tambor rotativo.

1.2.1. Biorreatores Típicos

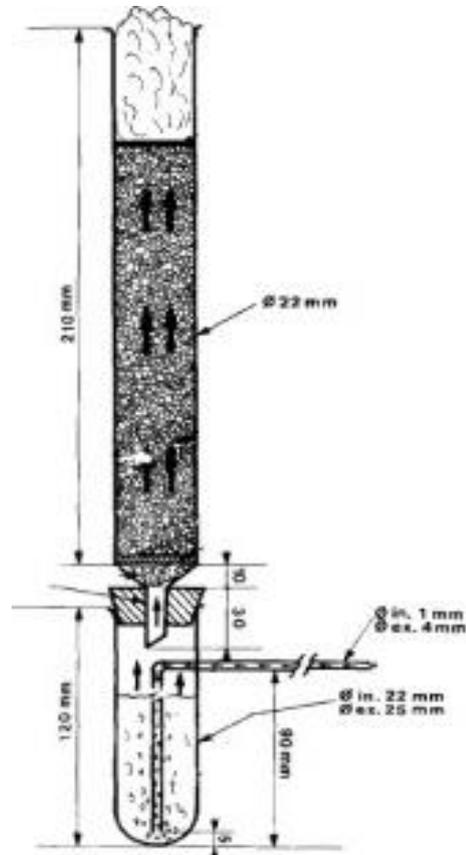
Em escala de bancada, frascos, placas de petri e erlenmeyers são os tipos de biorreatores muito utilizados. Isso se deve às suas facilidades operacionais, como o grande número de experimentos em paralelo. Porém, são limitados quanto à agitação e aeração, pois em geral são estáticos e as trocas dos gases ocorrem por difusão através da tampa porosa adaptada a cada modelo utilizado (Durand, 2003).

O biorreator construído em colunas, conforme mostrado na Figura 1.1 é um dos mais utilizados (Raimbault e Alazard, 1980), pois foi projetado para alguns gramas de substrato, servindo para estudos do comportamento de processos com relação às condições de aeração, umidade inicial do substrato, temperatura do meio (Farinas, C. S. *et al.*, 2011). A remoção de calor é feita através da parede da coluna que fica imersa em um banho termostatizado a uma temperatura definida pelo usuário. A aeração é feita pela parte inferior da coluna. Nos biorreatores do tipo tambor agitado/rotativo horizontal, a aeração pode tanto ser superficial ao substrato como ocorrer de maneira forçada, ou seja, o ar passa através do substrato. A agitação do mesmo é comumente realizada através de pás cujo movimento é transferido pelo eixo central que está acoplado a um motor, porém também são encontrados biorreatores nos quais as pás se encontram presas à parede externa que se movimenta. As principais vantagens relativas ao uso da agitação são: redução da heterogeneidade do meio, melhor circulação de gases e trocas de calor. A decisão acerca da geometria das pás e como será efetuado o seu movimento dependem principalmente das características do substrato que está sendo utilizado e da sensibilidade do microrganismo às tensões geradas pela agitação (Durand, 2003). A Figura 1.2 mostra o do tambor rotativo utilizado por Lindenfelser e Ciegler (1975) e a Figura 1.3 o tambor agitado utilizado por Nagel *et al* (2001).

A principal questão a ser considerada para os biorreatores de escala piloto e industrial é a remoção de calor. Essa se torna crítica devido aos grandes volumes de substrato sólido utilizados associados aos baixos coeficientes de trocas térmicas. Na maioria dos casos, a transferência de calor ocorre através do resfriamento evaporativo, que é definido pelo transporte de calor causado pela evaporação da água presente no meio fermentativo. Esse método depende

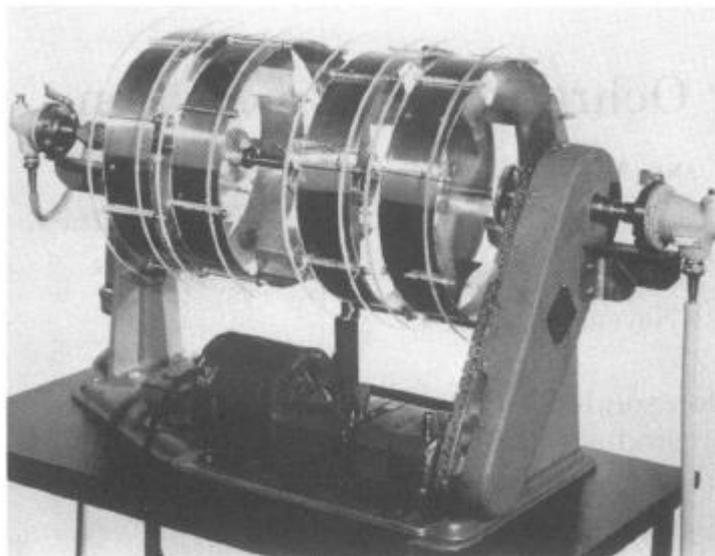
da área de superfície do meio em contato com a camada de ar da fase gasosa. As paredes do biorreator também cumprem importante papel no resfriamento do meio, contudo, são mais dependentes do volume do biorreator. Ambas metodologias são limitadas pela agitação ou não do meio (Nagel *et al.*, 2001b).

Figura 1.1: Biorreator do tipo colunas aeradas. As setas indicam a direção do fluxo de ar.



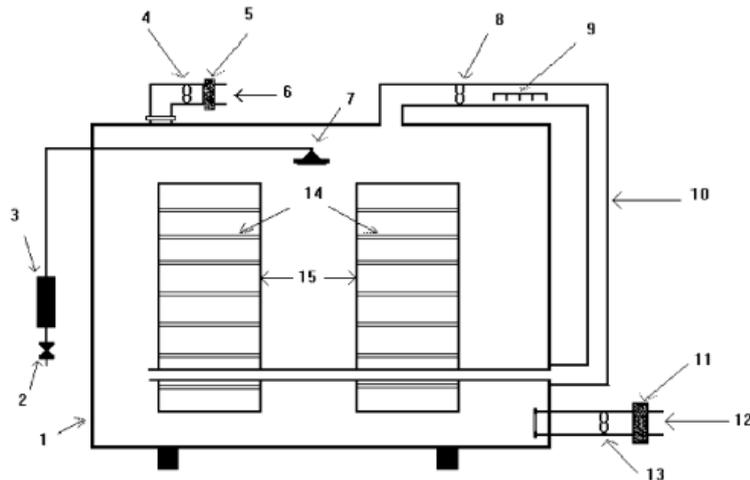
A Figura 1.1 foi copiada de Raimbault e Alazard, (1980).

Figura 1.2: Tambor rotativo utilizado nos estudos de Lindenfesler e Ciegler (1975).



Dentre os biorreatores não agitados o tipo Koji é provavelmente o mais antigo, mais simples e também um dos mais utilizados. São construídos em bandejas empilhadas, com no máximo 15cm de substrato em cada uma, sendo colocados em ambientes climatizados, com ou sem aeração forçada (Durand, 2003), conforme ilustra a Figura 1.5.

Figura 1.5: Biorreator do tipo Koji: (1) Sala climatizada, (2) válvula de água, (3) lâmpada UV, (4, 8, 13) ventiladores, (5, 11) filtros de ar, (6) saída de ar, (7) umidificador, (8) aquecedor, (10) recirculação de ar, (12) entrada de ar, (14) bandejas, (15) prateleiras para as bandejas.



A Figura 1.5 foi copiada de Durand (2003).

1.3. MODELAGEM MATEMÁTICA DE BIORREADORES E PROCESSOS DE FES

Modelos matemáticos de biorreatores são descritos em termos de balanços de massa e energia, afim de descrever o comportamento do meio fermentativo em função da atividade microbiana e das alterações das variáveis manipuladas (Mitchell *et al.*, 2006). Os fatores mais importantes a serem considerados são:

- Transferência de calor e massa entre o meio fermentativo e o ambiente ao seu redor (paredes do biorreator e fase gasosa do mesmo)
- Calor gerado pela atividade microbiana
- Consumo de substrato ou nutrientes em particular
- Consumo de O_2 ou produção de CO_2
- Produção e evaporação de água
- Formação de produtos

1.3.1. Transferência de Calor

A forma geral das equações de balanço de energia é descrita pela Equação 1.1:

$$m_{meio} C_{P_{meio}} \frac{dT_{meio}}{dt} = \pm Q_1 \pm Q_2 \pm Q_3 \pm \dots + r_Q \quad (1.1)$$

onde m_{meio} e T_{meio} são respectivamente a massa e a temperatura do meio fermentativo, $C_{P_{meio}}$ é o calor específico global do meio, r_Q é o calor gerado pela atividade microbiana e Q_1 , Q_2 e Q_3 representam diferentes parcelas da transferência de calor no biorreator.

Os processos de transferências de calor ocorrem principalmente por condução, convecção e evaporação. Para a condução têm-se as trocas através do meio, do meio com as paredes do biorreator e do meio com a fase gasosa. Também podem ser consideradas as trocas da parede do biorreator com o ambiente externo (Mitchell *et al.*, 2006). A Equação 1.2 descreve de forma o fenômeno:

$$Q_{cond} = k_{12} A_{12} (T_1 - T_2) \quad (1.2)$$

onde k descreve o coeficiente de convecção térmica entre os meios, A é a superfície de contato entre esses, T é a temperatura dos mesmos e os índices 1 e 2 são os meios em questão.

A convecção térmica é definida pelas trocas térmicas entre um meio e um fluido em movimento relativo. Em biorreatores de FES, ocorre principalmente entre o meio fermentativo e o ar que flui no interior do biorreator, entre o fluxo interno de ar e as paredes do mesmo e entre as paredes externas do biorreator e o meio externo. A convecção pode acontecer de forma natural ou forçada, de modo que a segunda acontece quando o fluido está em movimento forçado nas proximidades do meio de troca. No caso do meio fermentativo, a convecção pode ocorrer superficialmente ou no próprio meio, dependendo da agitação, porosidade do meio e circulação forçada de ar. A convecção forçada diminui a camada limite do ar que circula ao redor do meio, aumentando assim o coeficiente de transferência de calor (Mitchell *et al.*, 2006). A Equação (1.3) descreve esse fenômeno.

$$Q_{conv} = h_{12} A_{12} (T_1 - T_2) \quad (1.3)$$

Onde h descreve o coeficiente de convecção térmica entre os meios, A é a superfície de contato entre esses, T é a temperatura dos mesmos e os índices 1 e 2 são os meios em questão.

A evaporação é um fenômeno de grande impacto na capacidade de controle da temperatura do meio fermentativo em biorreatores de maior porte (Nagel *et al.*, 2001b). A taxa de evaporação térmica depende da atividade de água no meio, da área de contato desse com o ar, da umidade relativa e da velocidade superficial do ar circundante ao meio fermentativo. A atividade de água do meio é uma relação entre a massa de água e a massa de substrato seco, sendo definida pela disponibilidade de água para o microrganismo não retida no substrato sólido. Essa disponibilidade varia para cada substrato. A quantidade de água que evapora por unidade de tempo é definida pela pressão de vapor de água no ar da camada limite (substrato/fase gasosa) e a pressão de vapor da fase gasosa. De maneira geral, o ar da camada limite é considerado saturado de vapor, mas somente é válido para atividades de água próximos à 1. Sob essas condições, a Equação (1.4) expressa a taxa de evaporação de água e a Equação (1.5) o calor removido através da evaporação (Mitchell *et al.*, 2006).

$$r_{evap} = k_w A (y_g - y_L) \quad (1.4)$$

$$Q_{evap} = H_V k_w A (y_g - y_L) \quad (1.5)$$

Onde k_w é o coeficiente de transferência de massa por unidade de área por unidade de tempo, A é a área de contato entre as duas superfícies, y_g é a pressão de vapor da fase gasosa, y_L é a pressão de vapor da camada limite e H_V o calor latente de vaporização da água.

1.3.2. Transferências de Massa

As transferências de massa no interior de um biorreator estão predominantemente relacionadas ao consumo e produção de água e consumo de substrato. Essas transferências estão relacionadas em parte com a refrigeração do meio a partir do resfriamento evaporativo e através da respiração microbiana, na qual a reação de transformação de glicose em energia produz água e CO_2 (SHULER, 2002). A Equação (1.6) mostra a forma geral do equacionamento do balanço de água no substrato. Considera-se como principal mecanismo de remoção de água do meio a evaporação causada pela passagem de ar, descrita na Equação (1.4).

$$\frac{dM_a}{dt} = \pm R_1 \pm R_2 \pm R_3 \pm \dots \pm r_a \quad (1.6)$$

Onde Ma é a massa de água no meio, R_i , com $i = 1, 2, 3$, os mecanismos de transporte de água no meio e r_a a produção metabólica de água.

1.3.3. Cinética do Crescimento Microbiano

O crescimento microbiano é a principal causa das mudanças nas condições ambientais em processos de FES. Da respiração celular provem o calor que altera a temperatura do meio e a energia para todas as atividades bioquímicas. Das atividades bioquímicas provêm os metabólitos celulares que alteram o meio, que em sua maioria são os objetos de interesse em tais processos (Carlile *et al.*, 2001). Por esses motivos, o crescimento tem sido amplamente estudado e modelado, a fim de se compreender melhor seus mecanismos e também como otimizá-los. Em FES, os principais modelos utilizados para descrever o crescimento microbiano são mostrados na Tabela 1.2, na Figura (1.6) são mostrados os perfis de crescimento para cada um dos modelos.

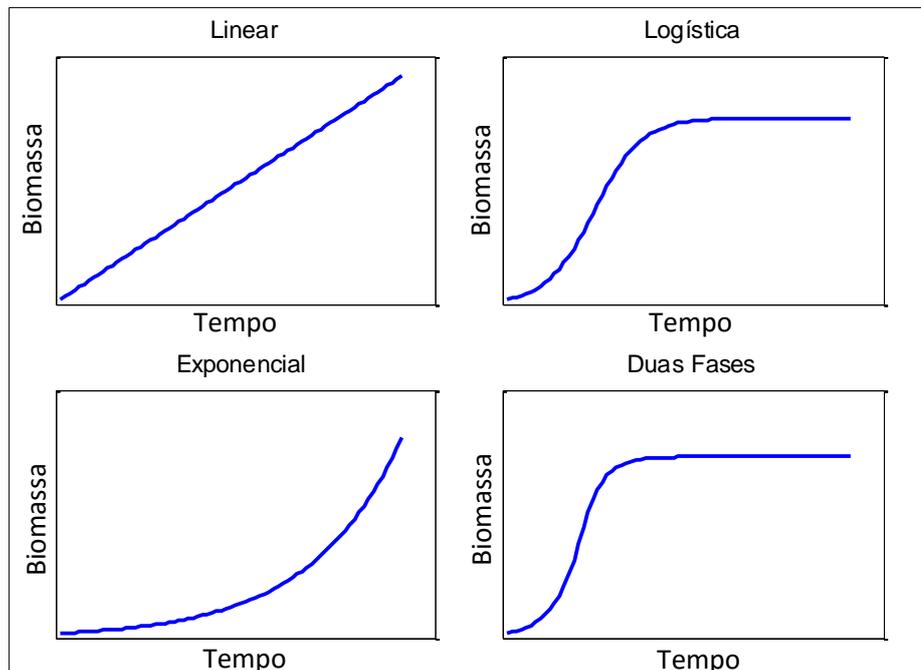
Tabela 1.2: Forma diferencial dos principais modelos de crescimento usados em FES (Mitchell *et al.*, 2006).

Nome	Equação	Número da Equação	Parâmetros
Linear	$\frac{dX}{dt} = k$	(1.7)	k
Logística	$\frac{dX}{dt} = \mu_M X \left(1 - \left(\frac{X}{X_M} \right)^n \right)$	(1.8)	μ_M, X_M, n
Exponencial	$\frac{dX}{dt} = \mu_M X$	(1.9)	μ_M
Duas Fases	$\frac{dX}{dt} = \begin{cases} \mu_M X, & t < t_a \\ K_D X e^{-\kappa t}, & t \geq t_a \end{cases}$	(1.10)	κ, K_D, μ_M, t_a

Os modelos de crescimento microbiano são ajustados/validados utilizando-se metodologias de glucosamina (Hamidi-Esfahani *et al.*, 2004) e/ou dados da respiração celular. Os dados de glucosamina retornam valores desta por massa seca de células, que posteriormente são convertidos em massa de células por massa seca de substrato. Essa medida é possível, pois se trata de uma substância presente somente nas células. Os dados da respiração celular são uma estimativa indireta da cinética de crescimento microbiano a partir da curva de respiração,

na qual a biomassa é calculada em função dos dados da respiração microbiana, conforme mostrado na seção 1.3.4.

Figura 1.6: Perfil de crescimento das Equações: Linear, Logística, Exponencial e Duas Fases.



A Figura 1.6 foi adaptada de Mitchell *et al* (2006).

1.3.4. Efeitos do Crescimento Microbiano

Os principais efeitos sofridos pelo substrato em função da atividade microbiana são: a liberação de calor, consumo de substrato, consumo de O_2 , produção de CO_2 e de água e formação dos produtos desejados. Esses efeitos estão relacionados com a respiração microbiana, descrita pela Equação (1.7), pois essa é reação responsável pela produção da energia necessária a todas as atividades celulares do microrganismo.



Nota-se ainda que as equações de balanço de massa e energia também estão relacionadas com a manutenção celular. Assim, as Equações de (1.8) a (1.12), determinadas pela dinâmica estudada por Ludueking-Piret (Shuler, 2002), descrevem, respectivamente, a produção de calor, a produção de água, o consumo de substrato, a produção de CO_2 e a formação dos produtos de interesse. A biomassa é descrita por X , Q é referente ao calor, S ao substrato e P ao produto

desejado. A Tabela 1.3 mostra alguns valores típicos na literatura para os parâmetros dessas Equações.

$$r_Q = Y_{QX} \frac{dX}{dt} + m_Q X \quad (1.8)$$

$$r_W = Y_{WX} \frac{dX}{dt} + m_W X \quad (1.9)$$

$$r_S = -\frac{1}{Y_{SX}} \frac{dX}{dt} - m_S X \quad (1.10)$$

$$r_{CO_2} = Y_{CO_2X} \frac{dX}{dt} + m_{CO_2} X \quad (1.11)$$

$$\frac{dP}{dt} = Y_{PX} \frac{dX}{dt} + m_P X - k_D P \quad (1.12)$$

Na Equação (1.12) o termo $-k_D P$ descreve a degradação do produto. Nas Equações de (1.8) a (1.12) os parâmetros Y_{ab} são os coeficientes de formação de produtos e consumo de substrato referentes ao crescimento celular e os parâmetros m_a são referentes à manutenção celular. Onde A é referente ao consumo de água, Q à geração de calor, S ao consumo de substrato, CO₂ à formação de CO₂ e P à formação de metabolitos de interesse. Nessas equações, X é referente à biomassa. Na Tabela 1.3, os índices W são referentes à água, o índice C ao CO₂ e o O ao O₂.

Tabela 1.3: Valores típicos dos parâmetros de produção de calor, gases e água e consumo de substrato.

Parâmetro	Microrganismo	Valor	Referência
Y_{QX}	Rhizopus oligosporus	$7983.10^6 \left[\frac{J}{kgX \cdot h} \right]$	Sargantanis et al (1994)
m_Q	Rhizopus oligosporus	$329,0.10^3 \left[\frac{J}{kgX \cdot h} \right]$	Sargantanis et al (1994)
Y_{QX}	Giberela fujikuroi	$1,54.10^7 \left[\frac{J}{kgS} \right]$	Pajan et al (1997)
m_Q	Giberela fujikuroi	$3.3.10^5 \left[\frac{J}{kgS \cdot h} \right]$	Pajan et al (1997)
Y_{WX}	Rhizopus oligosporus	$0,304 \left[\frac{kg_{H_2O}}{kgX} \right]$	Sargantanis et al (1994)
m_W	Rhizopus oligosporus	$0,304 \left[\frac{kg_{H_2O}}{kgX \cdot h} \right]$	Sargantanis et al (1994)

Y_{WO}	Aspergillus oryzae	$1,22 \left[\frac{mol_{H_2O}}{mol_{O_2}} \right]$	Nagel et al (2001b)
Y_{WO}	Giberela fujikuroi	$0,79 \left[\frac{mol_{H_2O}}{mol_{O_2}} \right]$	Lekanda e Perez-Correia (2004)
Y_{XS}	Rhizopus oligosporus	$0,599 \left[\frac{kgX}{kgS} \right]$	Sargantanis et al (1994)
m_S	Rhizopus oligosporus	$0,019 \left[\frac{kgX}{kgS \cdot h} \right]$	Sargantanis et al (1994)
Y_{XS}	Giberela fujikuroi	$0,55 \left[\frac{kgX}{kgS} \right]$	Thibault et al (2000b)
m_S	Giberela fujikuroi	$0,0125 \left[\frac{kgX}{kgS \cdot h} \right]$	Thibault et al (2000b)
Y_{CX}	Rhizopus oligosporus	$0,764 \left[\frac{kgCO_2}{kgX} \right]$	Sargantanis et al (1994)
m_C	Rhizopus oligosporus	$0,031 \left[\frac{kgCO_2}{kgX \cdot h} \right]$	Sargantanis et al (1994)
Y_{CX}	Giberela fujikuroi	$0,952 \left[\frac{kgCO_2}{kgX} \right]$	Thibault et al (2000b)
m_C	Giberela fujikuroi	$0,015 \left[\frac{kgCO_2}{kgX \cdot h} \right]$	Thibault et al (2000b)
Y_{PX}	Phanerochaet chrysosporium	$0,006 \left[\frac{kgEnz}{kg_{Glucosamina}} \right]$	Sharma-Shivappa et al (2014)
m_P	Phanerochaet chrysosporium	$4,15 \cdot 10^{-9} \left[\frac{kgEnz}{kg_{Glucosamina} \cdot d} \right]$	Sharma-Shivappa et al (2014)

Nesta tese, a modelagem matemática tanto do biorreator quanto do processo fermentativo são adaptações dos modelos encontrados na literatura às particularidades do processo desenvolvido. São consideradas particularidades do processo os mecanismos de crescimento microbiano e a instrumentação disponível no biorreator. Os principais objetivos da modelagem matemática são: auxiliar no desenvolvimento do controle do biorreator desenvolvido e na otimização da produção de enzimas celulolíticas.

1.4. INSTRUMENTAÇÃO E CONTROLE DE BIORREADORES DE FES

1.4.1. Instrumentação

O monitoramento e controle das condições ambientais em FES apresentam uma série de dificuldades oriundas da complexidade e heterogeneidade do meio fermentativo e da diversidade de geometrias nos biorreatores existentes (Bellon-Maurel *et al.*, 2003). Conforme já descrito, na FES o crescimento dos microrganismos se dá em um ambiente com ausência de água livre, o que resulta em baixos coeficientes de trocas térmicas e transferências de massa no meio fermentativo. Conseqüentemente, o microrganismo se desenvolve de maneira desigual por todo o substrato, o que gera gradientes nos efeitos associados ao seu crescimento. Também há que se considerar que existem biorreatores agitados e não agitados, com leitos horizontais ou verticais e em diversos formatos, cada um demandando um sistema de monitoramento e controle específicos.

A instrumentação é indispensável na detecção de condições operacionais anômalas de um biorreator e essencial para a correta realimentação das informações necessárias para o seu devido controle (Bellon-Maurel *et al.*, 2003). Essa pode ser dividida em: 1- aquisição dos sinais referentes variáveis de estado do processo; 2- acionamento das variáveis manipuladas do biorreator. As principais variáveis de estado de um processo de FES são:

- 1- Temperatura do meio fermentativo
- 2- Concentração dos gases expelidos
- 3- Umidade ou atividade de água do meio fermentativo
- 4- pH do meio fermentativo
- 5- Metabólitos produzidos.

Dentre essas variáveis, somente a (1) e a (2) são atualmente passíveis de serem medidas em tempo real, as demais requerem análises externas de amostras retiradas do biorreator (Mitchell *et al.*, 2006).

A medida da temperatura do meio é geralmente feita através de sensores resistivos (PT100 ou PT1000). Comumente são utilizados mais do que um sensor para a aquisição de dados espaciais para cálculo da temperatura média no biorreator. A disposição dos sensores depende da geometria do biorreator, mas são usualmente colocados próximos às paredes para evitar contatos com as pás que agitam o meio (Bellon-Maurel *et al.*, 2003).

As medidas de O₂ e CO₂ podem ser feitas simultaneamente na linha de saída de gás do biorreator. As medidas de oxigênio são comumente realizadas por cromatógrafos a gás, enquanto o gás carbônico é medido através de espectroscopia de infravermelho. Também são

utilizados métodos químicos, porém esses não permitem aquisição de dados em tempo real (Bellon-Maurel *et al.*, 2003).

As medidas da umidade do meio são comumente realizadas em balanças de umidade, as quais removem a água do substrato por evaporação, comparando a massa perdida com a inicial. Tentativas de se medir a umidade do meio também foram testadas por metodologias de espectroscopia de infravermelho, mas são facilmente implementadas em novos equipamentos (Bellon-Maurel *et al.*, 2003). Por sua vez, não existem eletrodos para se medir o pH em FES. Geralmente é adicionada uma solução tampão ao meio fermentativo para se compensar as variações do pH causadas pela atividade microbiana.

As variáveis que são usualmente manipuladas a fim de se controlar os estados de um biorreator de FES são:

1. Aquecimento/refrigeração
2. Fluxo de ar
3. Umidade relativa do ar
4. Velocidade de agitação do meio
5. Pressão interna do ar no biorreator.

Atreladas ao aquecimento/refrigeração do biorreator estão a temperatura e a umidade relativa do fluxo de ar que alimenta o mesmo. Isso ocorre, pois, a temperatura do ar que o alimenta varia de acordo com a temperatura do ambiente controlado, conseqüentemente a umidade relativa do ar aumenta ou diminui conforme a temperatura diminui ou aumenta, respectivamente. Do controle dessas variáveis resultam o resfriamento pelas paredes do biorreator e o resfriamento pela evaporação da água na camada limite entre a fase gasosa e o meio fermentativo. Além disso, a aeração é responsável pela retirada dos gases resultantes da atividade microbiana.

A velocidade de agitação do meio contribui com maiores coeficientes de trocas térmicas e conseqüente diminuição de gradientes de temperatura. Por outro lado, os microrganismos podem ser sensíveis à agitação, o que pode gerar perdas nos produtos de interesse (Sukumprasertsri *et al.*, 2013). Alguns trabalhos utilizam variações da pressão interna do biorreator com o objetivo de se melhorar as trocas térmicas no substrato. Essa metodologia é comumente empregada em biorreatores de leito fixo (He e Chen, 2013).

1.4.2. Controle dos Processos

A realimentação nas malhas de controle de processos tem sido largamente utilizada, porque traz melhorias em seus desempenhos. Isso ocorre, pois, os dados medidos nos instantes presente e passados são utilizados para se calcular as ações de controle que visam corrigir a trajetória das variáveis de estado do processo. Devido às facilidades de sintonia e implementação, os controladores Proporcional-Integrativo-Derivativo (PID) tem sido os mais utilizados no controle de processos industriais. Atualmente, cerca de 90% dos controladores utilizados em processos são PIDs. Mais especificamente, os controladores PI são mais largamente utilizados por causa da sensibilidade da ação derivativa aos ruídos provenientes dos sensores dos processos. (Astrom e Hagglund, 2001). Em processos de FES, os tipos de controladores mais comumente utilizados são: “ON/OFF” (Liga/Desliga), PID (clássico) e controladores preditivos (Mitchell *et al.*, 2006).

1.4.2.1. Controladores Liga/Desliga

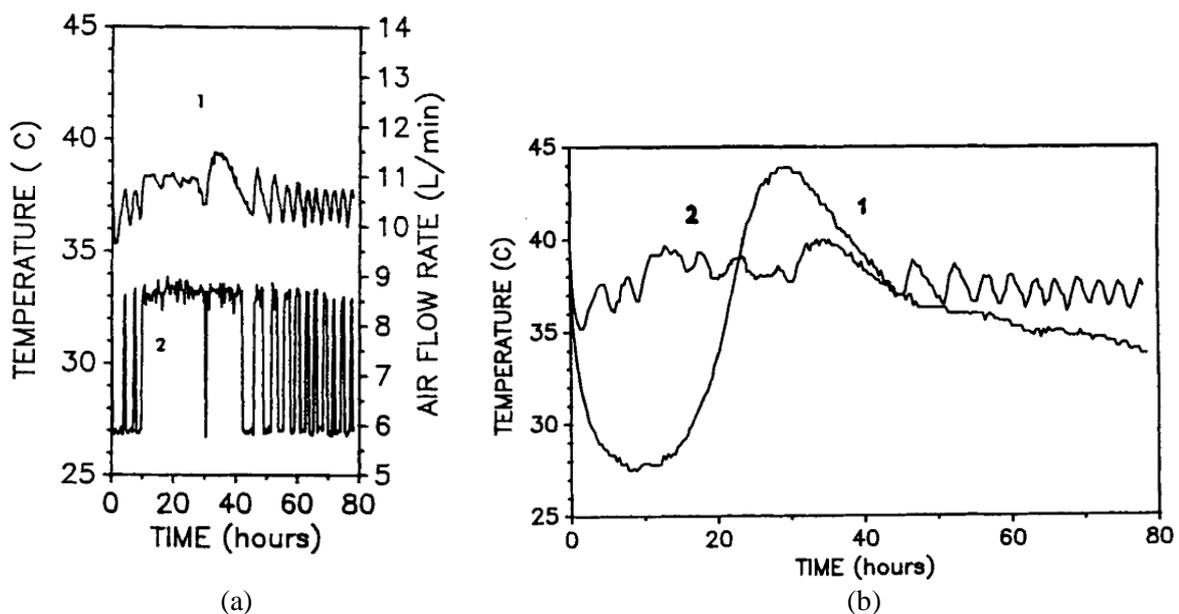
O ajuste de controladores do tipo Liga/Desliga é baseado em uma regra simples: se variável medida maior que referencia então liga, senão desliga. Por liga ou desliga também são consideradas alterações com nível fixo das ações de controle.

Barstow *et al* (1988) desenvolveram um biorreator do tipo tambor rotativo com quinze litros de volume total. O fungo *Rhizopus oligosporus* foi cultivado em uma mistura de amido de arroz com farinha de milho. O controle da temperatura do substrato era estabelecida através de duas estratégias: (1) quando a temperatura interna ficasse maior do que 37 °C o fluxo de ar aumentava de 6,2 L.min⁻¹ para 8,5 L.min⁻¹; (2) durante a fase de crescimento exponencial (por volta das 30 primeiras horas da fermentação) o ar foi mantido seco e úmido durante o restante da fermentação. A Figura 1.7 mostra os resultados obtidos.

Saucedo-Castañeda *et al* (1994) construíram um biorreator do tipo coluna com temperatura controlada, com 4 cm de diâmetro interno e 90 cm de altura. A temperatura do processo foi mantida por meio de uma jaqueta térmica que mantinha as paredes do biorreator a 30°C. Eles optaram por controlar a concentração de CO₂ na saída do biorreator ao cultivar *Schwanniomyces Castellii* CBS2863 em bagaço de cana, a qual deveria ser mantida com uma concentração igual ou inferior a 2%. O objetivo dessa abordagem foi manter a cultura em uma

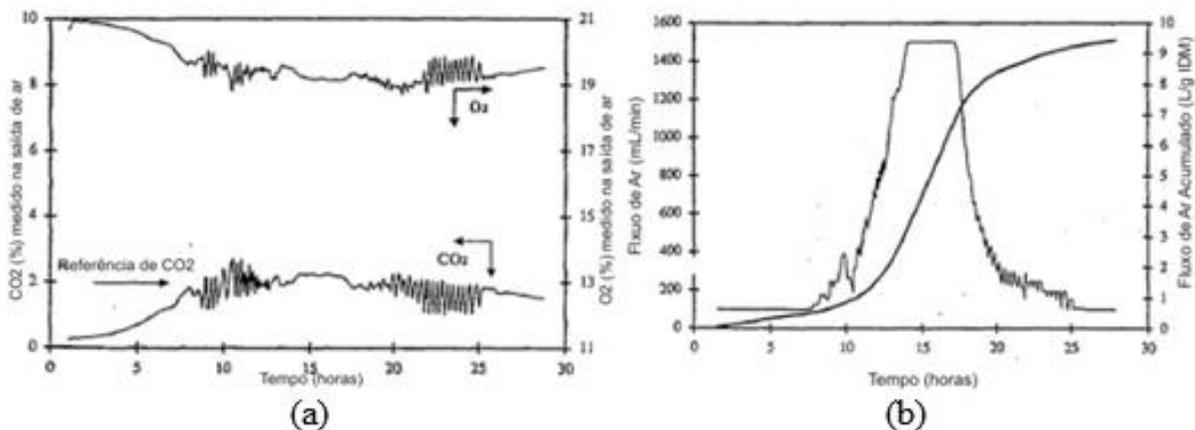
condição não limitante de oxigenação ao longo do processo. Para isso, foi realizada combinação de quatro válvulas solenoides que controlavam quatro linhas de ar capazes de prover respectivamente: $100\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $200\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $400\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $800\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O controle do fluxo de ar se dava pela combinação entre as mesmas, sendo capaz de injetar no máximo $1500\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de ar. A Figura 1.8 (a) e (b) ilustra o resultado do controle do CO_2 obtido por esse sistema e a Figura 1.9 a manutenção da temperatura em diferentes profundidades do biorreator.

Figura 1.7: (a) e (b): Resultado obtido com o resfriamento evaporativo com temperatura de referência de 37°C . Em (a), a curva (1) é a temperatura do leito do biorreator e (2) é o fluxo de ar. Em (b), (1) é a temperatura do leito do biorreator sem o controle de fluxo de ar e (2) é a temperatura sob controle.



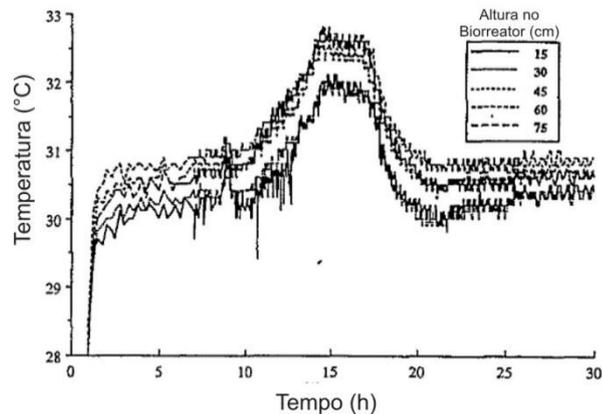
A Figura 1.7 foi copiada e adaptada de Barstow *et al* (1988).

Figura 1.8: Resposta de controle obtida pelo sistema. A Figura 1.8 (a) mostra a variação da concentração de CO_2 e O_2 durante a fermentação e em (b) o fluxo de ar controlado ao longo do processo.



A Figura 1.8 foi copiada e adaptada de Saucedo-Castañeda *et al* (1994).

Figura 1.9: Temperatura no leito do biorreator em diferentes alturas.



A Figura 1.9 foi copiada e adaptada de Saucedo-Castañeda *et al* (1994).

1.4.2.2. Controladores PID

Na maioria dos artigos referentes ao controle do processo de FES, os controladores PI e PID têm sido utilizados como medida de comparação de desempenho para outras metodologias, como os controladores preditivos e fuzzy (Perez-Correa e Fernandez-Fernandez, 2006; Sukumprasertsri *et al.*, 2013) (Von Meien *et al.*, 2004). Existem muitas metodologias de ajuste de parâmetros de controladores PI e PID (Astrom e Hagglund, 2001; Skogestad, 2003), no entanto, muito pouco foi abordado sobre metodologias que priorizam a rejeição dos distúrbios gerados pelo crescimento microbiano ou mesmo o acompanhamento da referência. Observada essa ausência de trabalhos que explorem o potencial do controlador mais amplamente difundido em processos, nesse trabalho serão exploradas algumas metodologias de ajuste baseadas nas características dinâmicas do processo. Essa escolha se deve às facilidades de serem empregadas e pela qualidade dos controladores obtidos (Astrom e Hagglund, 2004).

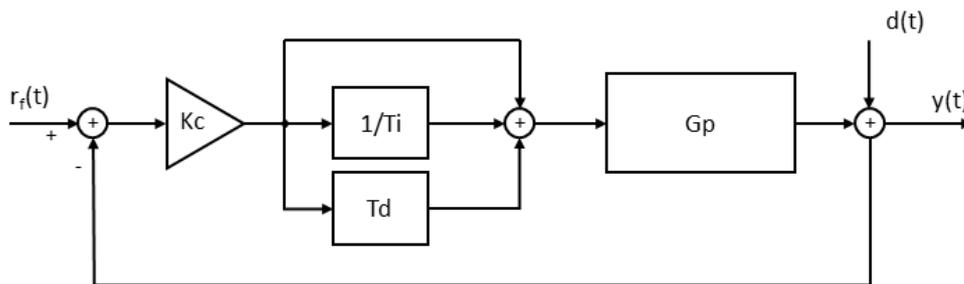
A Figura 1.10 ilustra o esquema geral de um controlador PID e as Equações (1.13) e (1.14) mostram, respectivamente, sua equação no tempo e no domínio da frequência. A Equação (1.15) mostra a saída do processo em função das entradas no domínio da frequência, onde $r_f(t)$ é o valor de referência da variável controlada e $d(t)$ a somatória do distúrbio causado pela atividade microbiana com os ruídos provenientes do sensor. Sendo que, K_c é o ganho proporcional do controlador, T_i o tempo de integração e T_d o tempo de derivação. Na Equação (1.13) y é a saída medida e t o instante em que o processo foi medido, nas Equações (1.14) e (1.15) s é a variável no domínio de Laplace, ou seja, da frequência. Em (1.14) e (1.15) G_c e G_p são respectivamente a função de transferência do controlador e da planta.

$$G_c(t) = K_c(y - r_f) + \frac{K_c}{T_i} \int_0^t (y - r_f) dt + K_c T_d \left(\frac{dy}{dt} - \frac{dr_f}{dt} \right) \quad (1.13)$$

$$G_c(s) = K_c \left(1 + \frac{1}{T_i s} + T_d s \right) \quad (1.14)$$

$$y(t) = \frac{G_c G_p}{1 + G_c G_p} r_f + \frac{1}{1 + G_c G_p} d \quad (1.15)$$

Figura 1.10: Diagrama genérico de um controlador PID.



A Figura 1.10 foi elaborada pelo autor da tese.

1.4.2.3. Controle Baseado em Previsão por Modelo

Os primeiros artigos direcionados ao MPC (*Model Predictive Controllers*) datam da década de 1970. No final dessa década a *Shell Oil* implementou os primeiros controladores industriais, denominados por DMC (*Dynamics Matrix Control*). O aspecto chave de um controlador MPC é o uso de um modelo dinâmico para prever o comportamento futuro do processo, isto é, os valores futuros das variáveis controladas. A ação de controle depende das características dinâmicas da planta a ser controlada. Portanto, o algoritmo de controle normalmente é projetado com base em um modelo da planta que descreve suas características dinâmicas (Seborg *et al.*, 2010).

Os controladores preditivos trabalham com sinais discretos no tempo, amostrados com período T , resultando em uma sequência de medidas $[y(0), y(T), y(2T), \dots, y(kT)]$. Os argumentos $0, T, \dots, kT$ denotam o tempo dado como múltiplos do intervalo de amostragem T . Baseando-se nessa sequência, o algoritmo de controle determina uma sequência de entrada

$[u(0), u(T), u(2T), \dots, u(kT)]$. O modelo dinâmico dos controladores DMC pode ser obtido a partir da resposta amostrada da saída do processo a uma variação do tipo degrau ou impulso em sua variável controlada (Seborg *et al.*, 2010).

A implementação de um controlador preditivo é feita a partir de um horizonte móvel de previsões, onde L futuras ações de controle são tomadas e R futuras saídas são previstas a cada novo instante de medição do processo, onde $R > L \in \mathbb{N}^*$. A Figura 1.11 ilustra esse conceito e as Equações (1.16) e (1.17) mostram como é calculada a matriz dinâmica que representa o processo (S_{MPC}).

$$\mathbf{A}_{MPC} = [y(0), y(T), y(2T), \dots, y(kT)] \quad (1.16)$$

$$\mathbf{S}_{MPC} = \begin{bmatrix} a_1 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ a_2 & a_1 & \dots & 0 & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \vdots \\ a_{R-1} & a_{R-2} & \dots & a_{R-L} & 0 \\ a_R & a_{R-1} & \dots & a_{R-L-1} & a_{R-L} \end{bmatrix} \quad (1.17)$$

Figura 1.11: Conceituação básica de horizonte móvel para controladores preditivos.

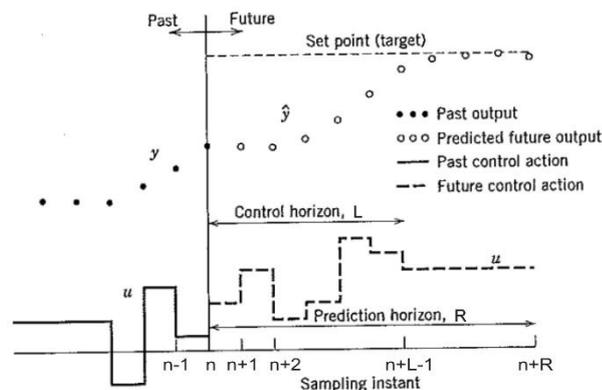


Figura copiada de (Seborg *et al.*, 2010).

Definidos os horizontes de controle e previsão, o próximo passo é determinar qual será a amplitude das ações de controle nos próximos L intervalos de amostragem, a fim de se minimizar o erro entre a referência a ser seguida e a saída prevista do processo. Para isso a função objetivo (J_u) é calculada pela Equação (1.18), onde \mathbf{P} e \mathbf{Q} são matrizes de ponderação que determinam a importância do erro em relação à amplitude das ações de controle, dadas respectivamente por (1.19) e (1.20).

$$\min_{\Delta U(k)} J_u = \hat{\mathbf{E}}^\circ(n)^T \mathbf{Q} \hat{\mathbf{E}}^\circ(n) + \Delta \mathbf{u}(n)^T \mathbf{P} \Delta \mathbf{u}(n) \quad (1.18)$$

$$\hat{\mathbf{E}}^\circ(n) = \mathbf{r}_f(n) - (\mathbf{S}\Delta\mathbf{u}(n) + \hat{\mathbf{Y}}^\circ(n) + \hat{\mathbf{b}}(n)) \quad (1.19)$$

$$\Delta\mathbf{u}(n) = (\mathbf{S}^T\mathbf{Q}\mathbf{S} + \mathbf{P})^{-1}\mathbf{S}^T\mathbf{Q}\hat{\mathbf{E}}^\circ(n+1) \quad (1.20)$$

sendo que $\mathbf{r}_f(n)$ é a referência da variável controlada no instante n , $\hat{\mathbf{Y}}^\circ(n)$ é o valor da saída não forçada prevista pela matriz dinâmica, $\Delta\mathbf{u}(n)$ as próximas ações de controle calculadas com base na previsão do erro futuro e $\hat{\mathbf{b}}(n)$ é o erro entre o valor da saída e o valor previsto pela matriz dinâmica no instante n . A saída prevista pela matriz dinâmica é calculada através da Equação (1.21). Por saída não forçada entende-se que a previsão da saída é feita com base nas ações de controle presente e passadas, não sendo consideradas em tal cálculo as ações futuras. Figura 1.12 mostra o diagrama de blocos desse controlador.

$$\hat{\mathbf{Y}}^\circ(n) = \begin{bmatrix} a_1 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ a_2 & a_1 & \dots & 0 & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \vdots \\ a_{R-1} & a_{R-2} & \dots & a_{R-L} & 0 \\ a_R & a_{R-1} & \dots & a_{R-L-1} & a_{R-L} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \Delta\mathbf{u}(0) \\ \Delta\mathbf{u}(1) \\ \vdots \\ \Delta\mathbf{u}(L-1) \\ \Delta\mathbf{u}(L) \end{bmatrix} \quad (1.21)$$

Figura 1.12: Esquema geral de um controlador MPC com realimentação de saída.

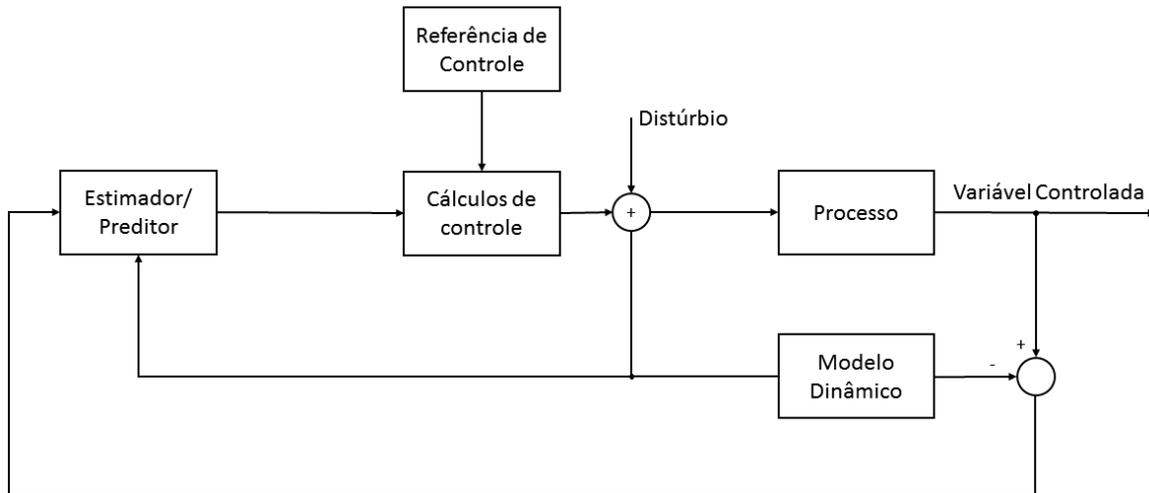


Figura adaptada de (Seborg *et al.*, 2010).

Em FES, modelos integrados que descrevam as interações do crescimento microbiano com os fenômenos de transporte no biorreator podem ser utilizados para o cálculo dos distúrbios futuros gerados pelos microrganismos. Isso pode resultar em ações de controle bastante precisas, no entanto, como se trata de processos biológicos, os parâmetros de crescimento podem variar de batelada para batelada. Além disso, devido à heterogeneidade do meio fermentativo, são observados muitos ruídos na temperatura do processo, demandando, portanto,

o desenvolvimento de um modelo capaz de lidar com essas variações do processo (Perez-Correa e Fernandez-Fernandez, 2006).

1.5. OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS DE FES

1.5.1. Planejamentos Fatoriais e Metodologia da Superfície de Resposta

Ao se desenvolver processos fermentativos industriais, o planejamento das condições operacionais dos mesmos é de vital importância para a produção dos metabólitos de interesse. Em FES, o pH, a temperatura e a umidade do meio fermentativo, assim como a agitação (quando aplicável) e a aeração são fundamentais para a produtividade do processo. Visto que o número de variáveis (ou fatores) passíveis de serem alteradas é grande, diversas estratégias para se avaliar o efeito das mesmas no desempenho dos processos foram desenvolvidas (Kennedy e Krouse, 1999; Banerjee e Bhattacharyya, 2003).

Uma vez definido o objetivo do estudo, ou seja, qual o produto ou relação de produtos que se deseja aprimorar, a avaliação de quais são os fatores mais influentes no mesmo é o próximo passo a ser tomado. Dentre as metodologias de otimização existentes comumente aplicadas em FES, se destacam os planejamentos fatoriais, o planejamento composto central rotacional e a operação evolucionária (Kumar *et al.*, 2011).

Os planejamentos fatoriais são formados a partir da combinação de todos os níveis de um fator com todos os níveis de cada um dos demais fatores em estudo, resultando em x^k experimentos, onde x é o número de níveis e k o de fatores. Em geral, esses planejamentos estão associados a modelos polinomiais de primeiro grau que expressam a relação entre os fatores e a saída desejada. A Tabela 1.4 mostra os experimentos a serem realizados e a Equação (1.20) mostra uma relação genérica da saída com três fatores (Singh *et al.*, 2005).

A otimização de um processo através da metodologia de superfície de resposta se dá através do cálculo do máximo ou do mínimo local, conforme objetivo definido, da função polinomial que ajusta os resultados obtidos. Esse procedimento é realizado através do caminho de maior gradiente até que o mesmo seja nulo, ou seja, um ponto de sela, um máximo ou um mínimo local (Kennedy e Krouse, 1999; Banerjee e Bhattacharyya, 2003). Esse procedimento também pode ser realizado computacionalmente resolvendo-se o polinômio para as variáveis e

encontrando-se as coordenadas que resultam no máximo ou o mínimo das soluções. Em FES, essa é a operação de otimização mais encontrada na literatura. A Figura 1.13 ilustra um planejamento fatorial composto central rotacional. Quando este último é comparado com o planejamento da Tabela 1.4, observa-se que o número de fatores é menor, no entanto, a superfície de resposta em geral indica com maior precisão as melhores condições operacionais do processo. Isso ocorre porque o polinômio que modela os efeitos é de segundo grau, trazendo maior precisão ao estudo.

Tabela 1.4: Lista de experimentos em um planejamento fatorial de 3 fatores.

Experimento	Fator		
	A (X_1)	B (X_2)	C (X_3)
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_4X_1X_2 + a_5X_1X_3 + a_6X_2X_3 + a_7X_1X_2X_3 \quad (1.20)$$

Figura 1.13: Diagrama de experimento de um planejamento composto central rotacional.

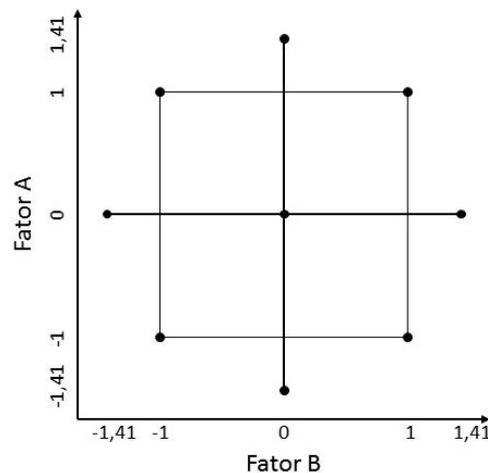


Figura adaptada de Singh, Kumar e Ahuja (2005).

1.5.2. Operações Evolucionárias

A operação evolucionária, por sua vez, consiste na aplicação sequencial de planejamentos fatoriais. A cada nova rodada, a região ótima da anterior é explorada. Essa busca ocorre sempre na direção do maior gradiente experimental e caso os valores estimados pelo modelo assumido sejam inferiores ao ótimo obtido anteriormente o procedimento se encerra. A Figura 1.14 mostra como esse procedimento é realizado (Kennedy e Krouse, 1999; Banerjee e Bhattacharyya, 2003).

Figura 1.14: Exemplo de uma operação evolucionária em três passos para dois fatores. As curvas de nível (linhas tracejadas) representam os resultados reais que fatores imprimem no produto desejado e os quadrados representam a evolução do planejamento fatorial com ponto central.

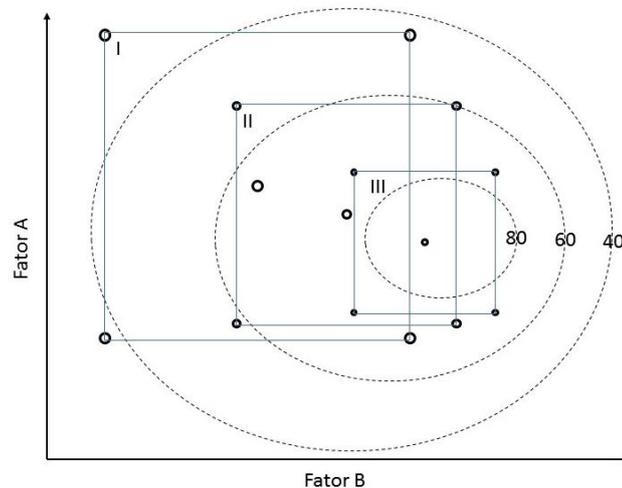


Figura adaptada de (Kennedy e Krouse, 1999; Banerjee e Bhattacharyya, 2003).

1.5.3. Modelagem Matemática

Os planejamentos experimentais também podem ser úteis para o estudo da dinâmica do processo em diversas condições operacionais. Consequentemente, havendo dados o suficiente, é possível desenvolver modelos matemáticos que sejam capazes de representar o processo em condições não avaliadas experimentalmente. Desse modo, é possível estudar o comportamento do processo em diversas condições e procurar quais trazem os melhores resultados com maior precisão do que utilizando planejamentos experimentais. Contudo, essa abordagem demanda uma quantidade de dados muito maior do que a dos planejamentos.

1.5.4. Programação Dinâmica Iterativa

Essa abordagem é uma combinação dos dois últimos métodos apresentados, executada computacionalmente. Isso quer dizer, através do modelo matemático é possível explorar o efeito que diversas condições operacionais têm sobre o processo e eleger qual traz o melhor resultado. Se isso for feito em período fixos de tempo, é possível que, iterativamente, o procedimento retorne um perfil das variáveis escolhidas que aumente a formação dos produtos desejados.

1.6. OBJETIVOS DA TESE

Os objetivos desta tese foram:

- Modelagem da produção enzimática de uma fermentação, primeiramente em função da temperatura e se necessário considerando a variação da umidade do substrato durante o processo.
- Desenvolvimento de um algoritmo de otimização utilizando as teorias de controle preditivo e programação dinâmica para se obter a melhor solução para um determinado processo fermentativo restrito a algumas condições iniciais.
- Simulação do modelo obtido submetido ao algoritmo de otimização dinâmica.
- Avaliação do algoritmo em uma fermentação em biorreator do tipo coluna.
- Desenvolvimento de um sistema de controle para a temperatura de um biorreator do tipo tambor rotativo utilizando controladores PI e preditivo.
- Avaliação do algoritmo em uma fermentação em um biorreator do tipo tambor rotativo

No Capítulo 2 é discutido e apresentado brevemente o desenvolvimento do biorreator do tipo tambor agitado utilizado nessa tese. São apresentados desenhos mecânicos, desenvolvimento da automação do biorreator através de programação gráfica (*Labview*TM) e elementos importantes do sistema eletrônico que atua no processo.

No Capítulo 3 é desenvolvida a modelagem matemática do processo, juntamente com um algoritmo cujo objetivo foi encontrar um perfil de temperaturas capaz de melhorar a produtividade do processo. Nesse capítulo são mostrados os procedimentos iterativos utilizados para identificar e aprimorar a acuidade do modelo frente às variações de temperatura ao longo

de um experimento. Também são mostradas as rotinas que o algoritmo de busca utiliza para procurar o perfil de temperaturas.

No Capítulo 4 são abordadas algumas metodologias de controle capazes de lidar com os distúrbios não lineares causados pelo crescimento microbiano. Um controlador Proporcional-Integrativo e um controlador preditivo baseado em modelo não linear são discutidos e comparados com relação ao acompanhamento das trajetórias propostas no Capítulo 3. Foram estudadas uma referência fixa e uma variante no tempo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTROM, K. J.; HAGGLUND, T. The future of PID control. **Control Engineering Practice**, v. 9, n. 11, p. 1163-1175, Nov 2001. ISSN 0967-0661. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000172597300002 >.

Revisiting the Ziegler-Nichols step response method for PID control. **Journal of Process Control**, v. 14, n. 6, p. 635-650, Aug 2004. ISSN 0959-1524. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000221249000005 >.

BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C. Evolutionary operation as a tool of optimization for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 149-155, Mar 2003. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000180950500008 >.

BELLON-MAUREL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: A review. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 881-896, January 31 2003. ISSN 1359-5113. Disponível em: <<Go to ISI>://BIOABS:BACD200300121135 >.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The Fungi**. Academic Press, 2001. 588 p.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 113-125, Mar 2003. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000180950500005 >.

EL-BAKRY, M. et al. From Wastes to High Value Added Products: Novel Aspects of SSF in the Production of Enzymes. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 18, p. 1999-2042, Sep 17 2015. ISSN 1064-3389. Disponível em: <<Go to ISI>://CCC:000356421300002 >.

FARINAS, C. S. et al. Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 1186-1192, Jul 2011. ISSN 0926-6690. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000293320100056 >.

HAMIDI-ESFAHANI, Z.; SHOJAOSADATI, S.; RINZEMA, A. Modelling of simultaneous effect of moisture and temperature on A-niger growth in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, n. 3, p. 265-272, NOV 2004 2004. ISSN 1369-703X.

HE, Q.; CHEN, H. Pilot-Scale Gas Double-Dynamic Solid-State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 10, p. 2916-2924, Oct 2013. ISSN 1935-5130. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000323881800032 >.

HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175-186, Apr 2004. ISSN 0175-7598. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000220565100004 >.

KENNEDY, M.; KROUSE, D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 456-475, Dec 1999. ISSN 1367-5435. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000084919900002 >.

KUMAR, S. et al. Use of evolutionary operation (EVOP) factorial design technique to develop a bioprocess using grease waste as a substrate for lipase production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 7, p. 4909-4912, Apr 2011. ISSN 0960-8524. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000288637000046 >.

LI, Y.; PENG, X.; CHEN, H. Comparative characterization of proteins secreted by *Neurospora sitophila* in solid-state and submerged fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 4, p. 493-498, Oct 2013. ISSN 1389-1723. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000326559500014 >.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. **Solid-State Fermentation Bioreactors**. Springer-Verlag, 2006. 480p.

NAGEL, F. et al. Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, n. 2, p. 219-230, Jan 2001. ISSN 0006-3592. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000166233500010 >.

PEREZ-CORREA, J. R.; FERNANDEZ-FERNANDEZ, M. Predictive controller evaluation including non-stationary high frequency noise and outliers for batch solid substrate fermentation bioreactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 29, n. 5-6, p. 399-407, Dec 2006. ISSN 1615-7591. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000243261500012 >.

PIROTA, R. D. P. B.; BALEEIRO, F. C. F.; FARINAS, C. S. Saccharification of biomass using whole solid-state fermentation medium to avoid additional separation steps. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 6, p. 1430-1440, 2013. ISSN 1520-6033. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/btpr.1811> >.

RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. CULTURE METHOD TO STUDY FUNGAL GROWTH IN SOLID FERMENTATION. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 199-209, 1980 1980. ISSN 0340-2118.

SEBORG, D. E. et al. **Process Dynamics and Control**. 3 edition. Wiley, 2010. 528.

SINGH, B.; KUMAR, R.; AHUJA, N. Optimizing drug delivery systems using systematic "Design of experiments." Part I: Fundamental aspects. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 22, n. 1, p. 27-105, 2005 2005. ISSN 0743-4863. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000226954300002 >.

SKOGESTAD, S. Simple analytic rules for model reduction and PID controller tuning. **Journal of Process Control**, v. 13, n. 4, p. 291-309, Jun 2003. ISSN 0959-1524. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000181778400002 >.

STUART, D. M.; MITCHELL, D. A. Mathematical model of heat transfer during solid-state fermentation in well-mixed rotating drum bioreactors. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 78, n. 11, p. 1180-1192, Nov 2003. ISSN 0268-2575. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000185854700010 >.

STUART, D. M. et al. Solid-state fermentation in rotating drum bioreactors: Operating variables affect performance through their effects on transport phenomena. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, n. 4, p. 383-391, May 20 1999. ISSN 0006-3592. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000079313700001 >.

SUKUMPRASERTSRI, M. et al. Fuzzy Logic Control of Rotating Drum Bioreactor for Improved Production of Amylase and Protease Enzymes by *Aspergillus oryzae* in Solid-State Fermentation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 335-342, Mar 2013. ISSN 1017-7825. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000316919500008 >.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146-161, Dec 15 2013. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000329772500018 >.

VON MEIEN, O. F. et al. Control strategies for intermittently mixed, forcefully aerated solid-state fermentation bioreactors based on the analysis of a distributed parameter model. **Chemical Engineering Science**, v. 59, n. 21, p. 4493-4504, Nov 2004. ISSN 0009-2509. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000224292700010 >.

2. DESENVOLVIMENTO, CONSTRUÇÃO, AUTOMAÇÃO E INSTRUMENTAÇÃO DE UM BIORREATOR DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

2.1. INTRODUÇÃO

Diversos tipos de biorreatores foram desenvolvidos para uso em fermentação em estado sólido. Em geral, são classificados principalmente conforme a agitação e a aeração, sendo chamados de agitados ou de estáticos e com aeração forçada ou circundante ao meio. A escolha do tipo de agitação e aeração está vinculada à velocidade de crescimento do microrganismo e a sensibilidade do mesmo ao cisalhamento das hifas. Outras questões que surgem são: o quanto o produto final e o substrato são afetados pela agitação; o quanto o microrganismo é afetado por variações da temperatura e da umidade do meio? As variações de temperatura estão ligadas à agitação e a umidade relacionada com a aeração. Atrelada a aeração também está a oxigenação do processo, visto que a maioria dos fungos utilizados em FES é aeróbia (Mitchell *et al.*, 2006).

Fungos do gênero *Aspergillus* têm se mostrado resistentes ao estresse da agitação conforme apresentado por (Gasiorek, 2008). Neste trabalho foi cultivada a cepa *Aspergillus niger S* em um biorreator do tipo tambor rotativo com volume total de 4,5L com agitação variando entre uma agitação contínua de 16 RPM (rotações por minuto) à uma intermitente de 16 RPM durante um minuto a cada 24 horas. Nesse intervalo, a formação dos produtos de interesse foi prejudicada para agitações contínuas acima de 4 RPM. Já (Stuart *et al.*, 1999)) utilizaram um biorreator tambor rotativo com volume total de 18,7 L. Nesse trabalho, a agitação foi testada com velocidade entre 0 RPM e 50 RPM. Foi observado que para agitações maiores que 10 RPM, conforme aumenta-se a velocidade, produz-se menos proteínas, produto avaliado neste estudo. Concluíram que as perdas estão associadas a danos causados por cisalhamento nas hifas. Além disso, observaram que as perdas também estão associadas à massa de substrato deslocada durante à agitação.

Visto que o gênero de microrganismo estudado nesse trabalho não sofre com uma agitação moderada do processo, outro ponto de interesse é a capacidade de controle da temperatura interna do biorreator. Biorreatores de leito fixo costumam apresentar variações de temperatura de até 3°C/cm (Weber *et al.*, 1999; Durand, 2003), sendo que em alguns casos a temperatura medida no meio foi de até 7°C maior do que a desejada. Para biorreatores de leito

fixo, uma alternativa que tem sido muito utilizada para o controle da temperatura é o uso de variações na pressão interna do biorreator. Através do constante aumento e diminuição da pressão, o ar é forçado através do meio fermentativo, removendo calor durante a despressurização (Chen e He, 2013; He e Chen, 2013).

No entanto, caso seja de interesse construir um biorreator de fluxo contínuo, (Mitchell *et al.*, 2006) sugerem o uso de tambores rotativos ou tambores agitados, pois as próprias pás e aletas utilizadas para o revolvimento do substrato podem ser utilizadas para o transporte do meio fermentativo. Além disso, o uso de pás ou aletas agitadoras contribuem ativamente na mistura do meio fermentativo durante o processo, diminuindo tanto os gradientes de temperatura quanto a formação de blocos aglomerados do meio fermentativo, propiciando uma melhor oxigenação do processo e um melhor crescimento microbiano. Considerando as características dos biorreatores descritos e a vantagem de se utilizar um processo contínuo, o biorreator escolhido para ser construído nesse trabalho foi um tambor agitado de 10 litros de volume total.

Esse capítulo tem por objetivo detalhar o desenvolvimento mecânico, eletrônico e o software elaborado em Labview que opera o biorreator. Também foi utilizada a ferramenta MathScript, que realiza a interface de informações entre o Labview e o Matlab, a fim de que o processamento do modelo do biorreator seja realizado no Matlab.

2.2. METODOLOGIA

No desenvolvimento de qualquer produto, o primeiro passo é sempre definir quais são as suas funções e características. Referente ao biorreator desenvolvido, os objetivos gerais a serem alcançados foram: construção de um biorreator de tambor agitado com controle do fluxo de ar, controle da agitação e temperatura do meio. Para alcançar tais objetivos, as seguintes funções foram definidas:

- Desenho mecânico do biorreator
- Controle da agitação
- Controle do fluxo de ar
- Controle da temperatura das paredes externas do biorreator
- Sonda de temperatura para o meio interno
- Software para automação do biorreator

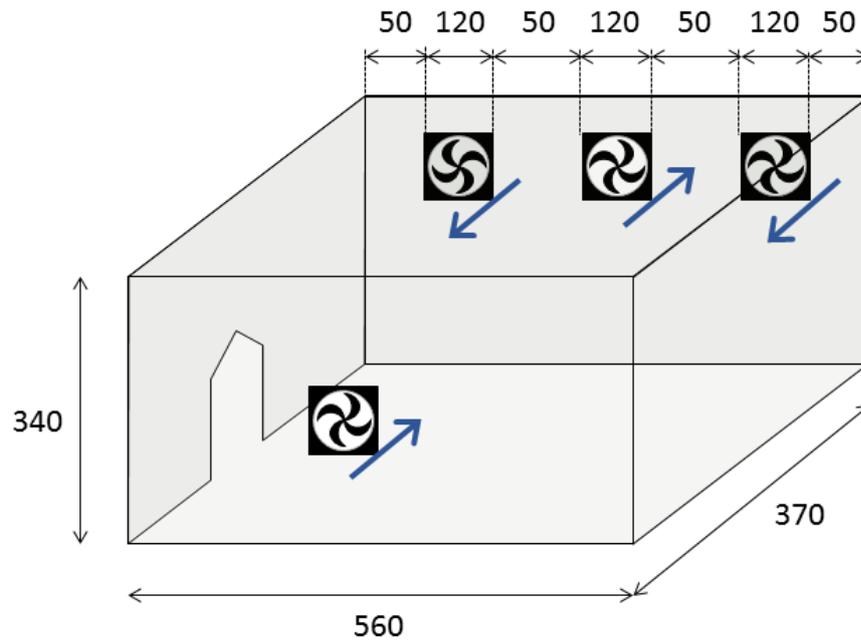
- Inicialização dos processos eletrônicos, aquisição e gravação de dados, processos automáticos, integração com o software Matlab para resolução de equações diferenciais ordinárias.
- Acabamento do produto
 - Empacotamento do sistema eletrônico e aquisição de dados em gabinete apropriado, empacotamento do cabeamento de transmissão de sinais e comandos para e do biorreator.

2.2.1. Desenho Mecânico do Biorreator

O biorreator utilizado nesse trabalho é constituído de um tubo de aço inox, de 20 cm de diâmetro por 34 cm de comprimento com duas pás agitadoras acopladas ao eixo central, conforme ilustrado na Figura 2.1. O tambor de fermentação é separado da base, conforme mostrado na Figura 2.2, com o objetivo de esterilização do processo sem que seja necessário expor o seu conteúdo ao ambiente externo. O principal uso dessa separação é a esterilização do processo ao seu final, a fim de se evitar contaminações em outros estudos do laboratório. A esterilização no início do processo depende do tipo de microrganismo que será empregado. Microrganismos de crescimento rápido, como os do gênero *Aspergillus* não costumam demandar essa etapa. O conjunto do tambor de fermentação possui cerca de 40 cm de comprimento, o que inclui as paredes laterais e o duto de entrada de ar que é fixo na parede que fica do lado do motor de acionamento das pás. A saída de ar, indicada na peça 9b, foi fixada na base lateral do biorreator onde está montada a sonda de temperatura. Salienta-se que as figuras não estão em escala e as cotas informa suas medidas aproximadas em milímetros.

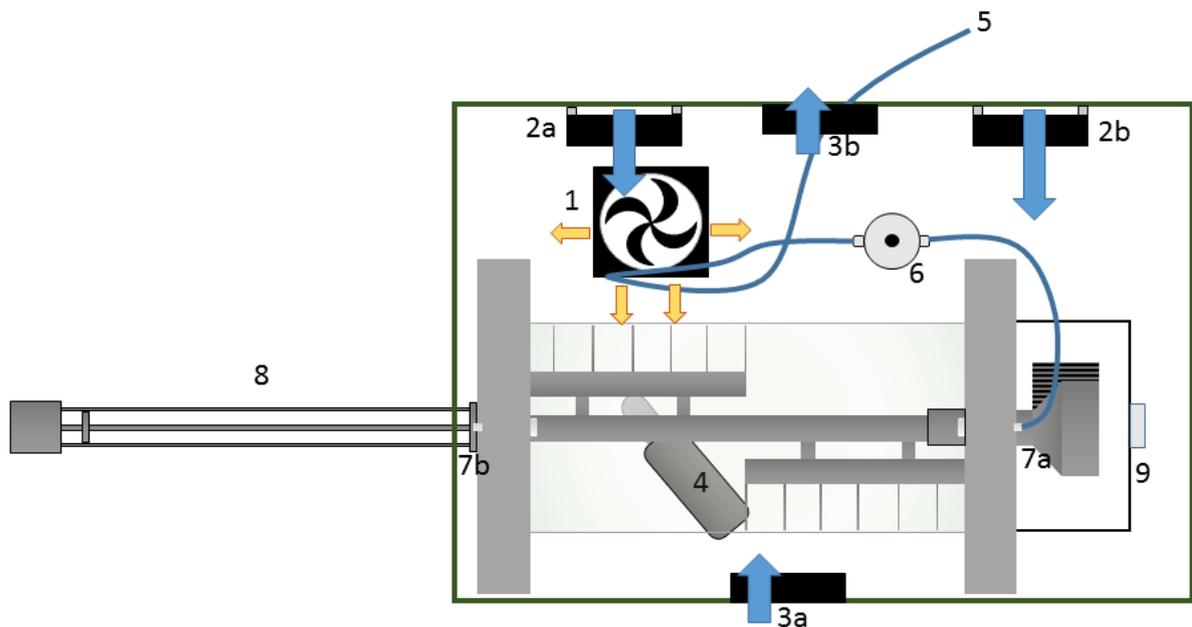
A cuba para controle da temperatura da parede externa do biorreator, Figura 2.3, foi construída em policarbonato, com dimensões de 56 cm de comprimento, 37 cm de largura e 34 cm de altura. A espessura das placas de policarbonato foi de 5mm. Isso resultou em uma área superficial com o ambiente externo da mesma de cerca de 1m^2 e coeficiente de condução térmica entre sua parede interna e externa de aproximadamente $7,8\text{ W/m}^2\text{C}$. Esse valor foi determinado calculando-se a diferença entre a temperatura interna e a externa para uma potência de aquecimento de 250W, temperatura interna de 55°C e externa de 23°C . O sistema de refrigeração utilizado foi realizado por uma troca forçada do ar interno da cuba, conforme apresentado na Figura 2.3. Nessa, as peças 1 e 3 são os ventiladores responsáveis pela circulação de ar no interior da cuba. Os ventiladores 2 e 4 são responsáveis pela troca do ar interno da

Figura 2.3: Cuba para controle da temperatura do processo.



A Figura 2.3 foi elaborada pelo autor dessa tese.

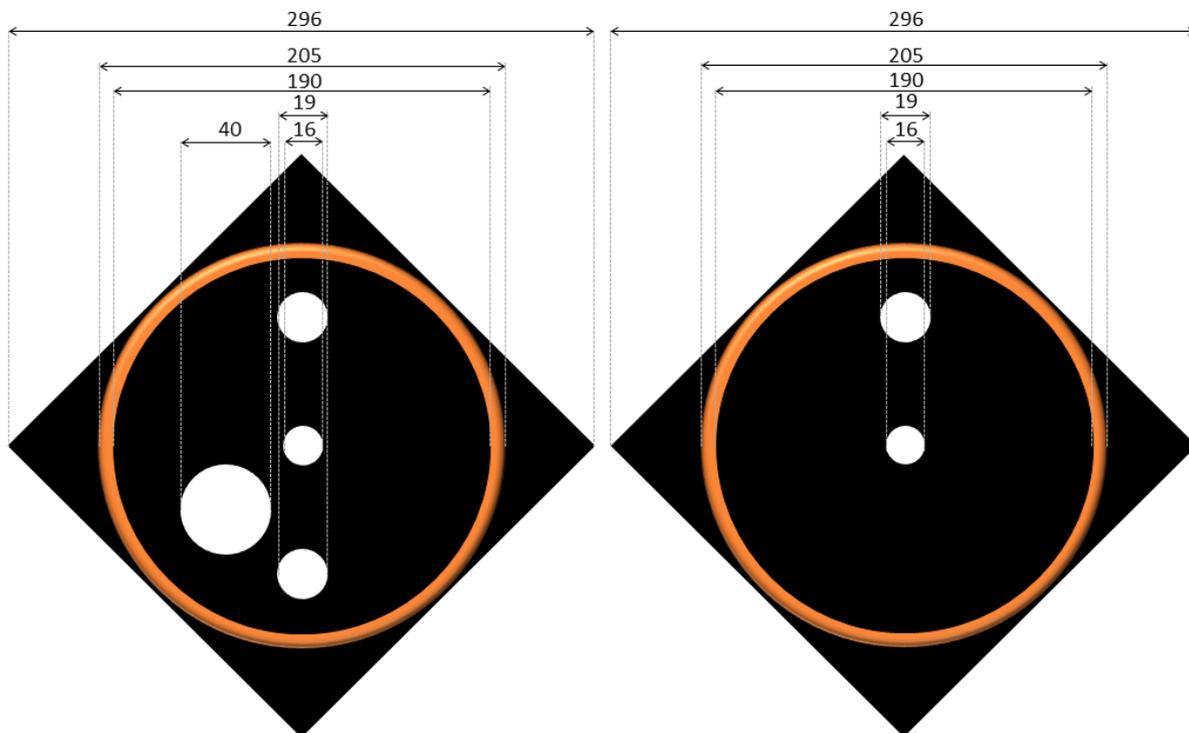
Figura 2.4: Vista superior do biorreator em condições operacionais. São as partes dessa figura: 1- Aquecedor da cuba e da linha de alimentação de ar; 2 a, b- ventiladores para circulação interna de ar; 3 a, b- entrada e saída de ar forçada para refrigeração da cuba; 4- sensor da temperatura interna da cuba; 5- linha de alimentação de ar; 6- sensor de temperatura e umidade relativa do ar que alimenta o biorreator; 7a entrada de ar do biorreator e 7b- saída de ar do biorreator; 8- sonda de temperatura do meio; 9- suporte metálico para conectores eletrônicos e proteção do conjunto motor/redução. As setas indicam o sentido do fluxo de ar, as setas laranjas representam o ar aquecido.



A Figura 2.4 foi elaborada pelo autor dessa tese.

As tampas laterais, tanto do tambor de fermentação como das bases laterais do biorreator, foram construídas em policarbonato. Além das características favoráveis à usinagem, esse plástico apresenta elevado ponto de fusão, cerca de 165°C. Isso permite que o mesmo seja levado à uma autoclave de vapor com temperaturas de 125°C, essencial para esterilização do processo, sem deformações que comprometam a geometria funcional do biorreator ou mesmo formação de fumos prejudiciais ao processo. Na Figura 2.4 são mostradas as tampas do tambor de fermentação com a furação necessária para amostragem do processo, posicionamento do eixo de transmissão e suporte da pás e entrada e saída de ar. Destacado em laranja nessa Figura está a vedação feita à base de silicone para vedação de juntas térmicas. Essa vedação tem por objetivos não permitir que o substrato em movimento saia do interior do biorreator, e também que o ar seja conduzido ao sensor de CO₂ instalado em compartimento externo.

Figura 2.5: Tampas do tambor de fermentação.

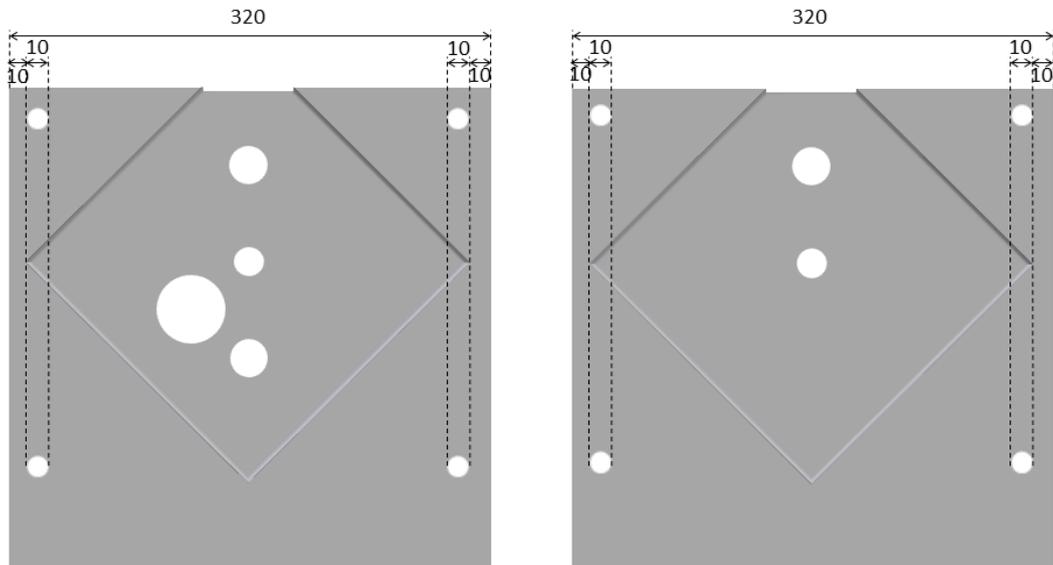


A Figura 2.5 foi elaborada pelo autor dessa tese.

A Figura 2.6 mostra o acoplamento do tambor de fermentação às bases laterais do biorreator. Para essa montagem, primeiramente as tampas do tambor de fermentação foram dimensionadas e usinadas. Suas dimensões foram sobrepostas às placas das bases laterais que foram usinadas de forma que as tampas pudessem se encaixar mesmo que estivessem a uma

temperatura muito maior do que das bases. A furação foi conduzida com as placas encaixadas em suas posições finais, de modo que não houvessem problemas com o alinhamento dos furos.

Figura 2.6: Bases laterais para suporte do tambor de fermentação.



A Figura 2.6 foi elaborada pelo autor dessa tese.

2.2.2. Agitação do processo

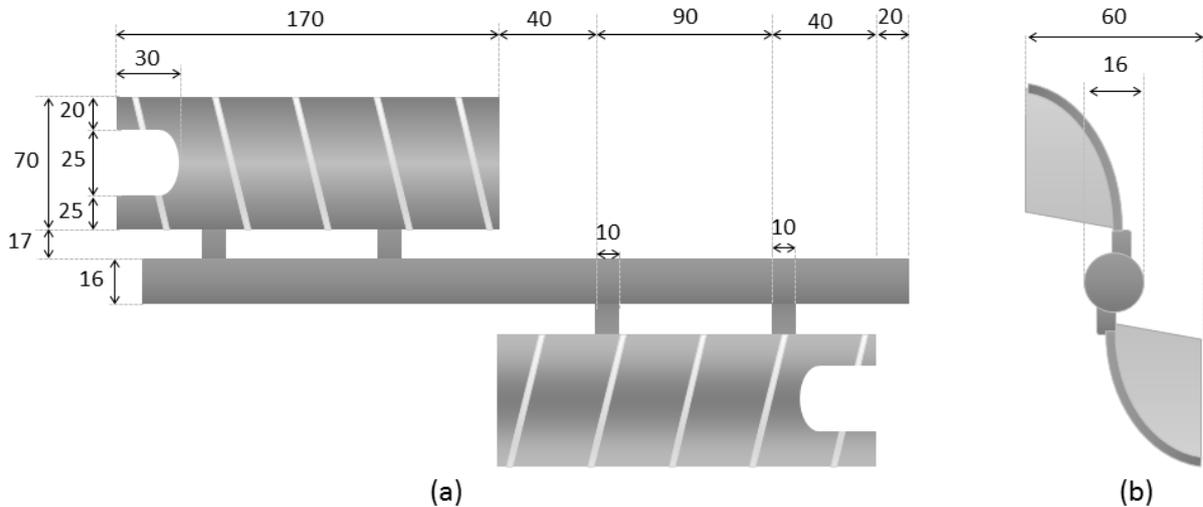
2.2.2.1. Pás Agitadoras

No primeiro estágio do desenvolvimento do tambor agitado, o sistema de agitação era controlado por um motor de passo e a transmissão do torque do motor para o eixo era feita por uma redução com duas polias sincronizadas conectadas por uma corrente. Com esse sistema de transferência de movimento inicial foram testadas as três primeiras versões das pás agitadoras, mostradas na ordem em que foram desenvolvidas, respectivamente as Figuras 2.7, 2.8 e 2.9. Durante essas três primeiras versões, o tubo utilizado para contenção do substrato era feito de vidro temperado. Por esse motivo, as análises dos efeitos da agitação e formato das pás eram concluídas rapidamente.

Os pré-requisitos estabelecidos para as pás agitadoras foram: não haver compactação do substrato e não haver formação de aglomerados. Mais dois requisitos poderiam ser incluídos: evitar aglomeração de material tanto nas paredes laterais e quanto nas paredes do tubo. Mas não houve tempo suficiente para realizar as adaptações técnicas necessárias a tais

disso, os furos adicionados não diminuiram os problemas de excesso de torque a cada giro, repetindo os problemas da primeira pá.

Figura 2.8: Segunda versão das pás agitadoras. Em (a) tem-se a vista frontal e em (b) a vista lateral.



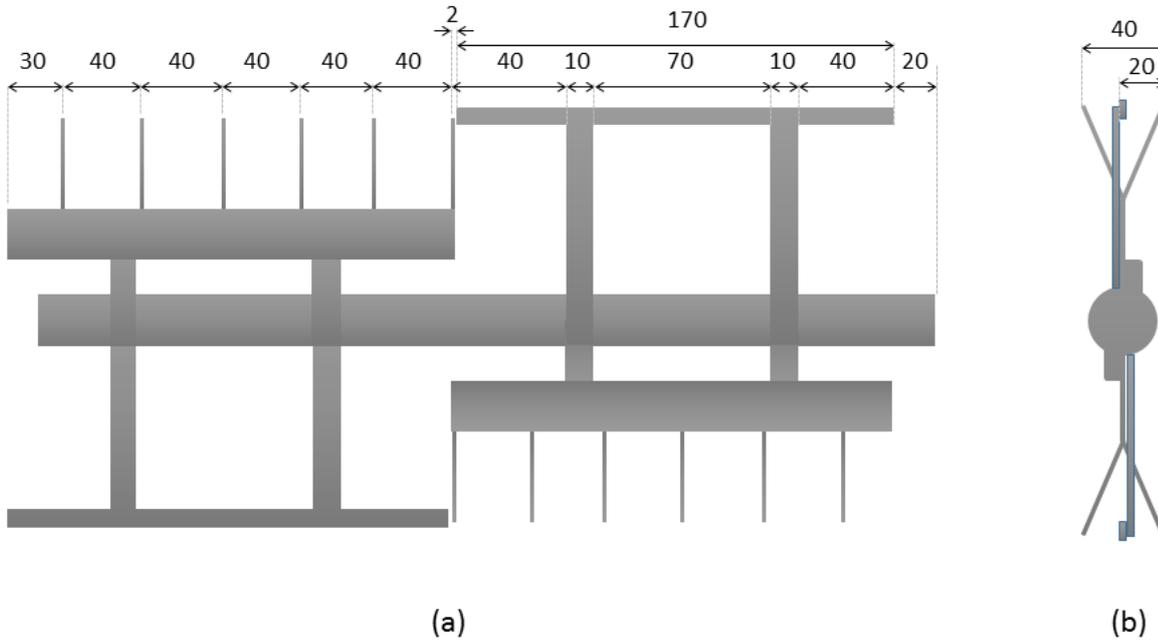
A Figura 2.8 foi elaborada pelo autor dessa tese.

A terceira versão desenvolvida trouxe as qualidades de ambas as pás desenhadas anteriormente, conforme a Figura 2.9. Para facilitar o revolvimento do substrato e permitindo a quebra dos aglomerados, a pá foi desenhada no formato de um escarificador de um lado, que é encontrado em moto niveladoras, e do outro um rodo. Do lado do escarificador em linha, cuja distância inicial entre os dentes foi de 5 cm, mas ainda assim o substrato aglomerava entre os mesmos. Por esse motivo, os dentes passaram a ser dispostos em ângulo, o que facilitou o efeito procurado. Porém, para o rodo desenhado, uma vez que o mesmo passa próximo à parede, mas não rente à mesma, após 24 horas de testes, a maior parte do substrato se encontrava compactado nas paredes do biorreator, sendo inclusive difícil sua remoção.

A última versão das pás agitadoras foi simplesmente uma simplificação do desenho da terceira versão, na qual o rodo para remoção de acúmulos na parede interna do tubo foi removido, conforme ilustrado na Figura 2.10. Com essa alteração, o substrato continuou sendo acumulado no tubo, porém de forma não compactada, o que permitiu que os microrganismos instalados ali respirassem a cada revolvimento do substrato. Ainda é possível melhorar a geometria das pás, porém não houve tempo suficiente para o aprimoramento necessário. Após uma fermentação, foram medidas a massa de substrato livre no leito do biorreator e a massa total presente. A massa total medida foi de 1400 gramas e a massa livre foi de 800g. Em outro experimento, foi estimada a biomassa total no meio fermentativo. Essa estimativa foi de cerca

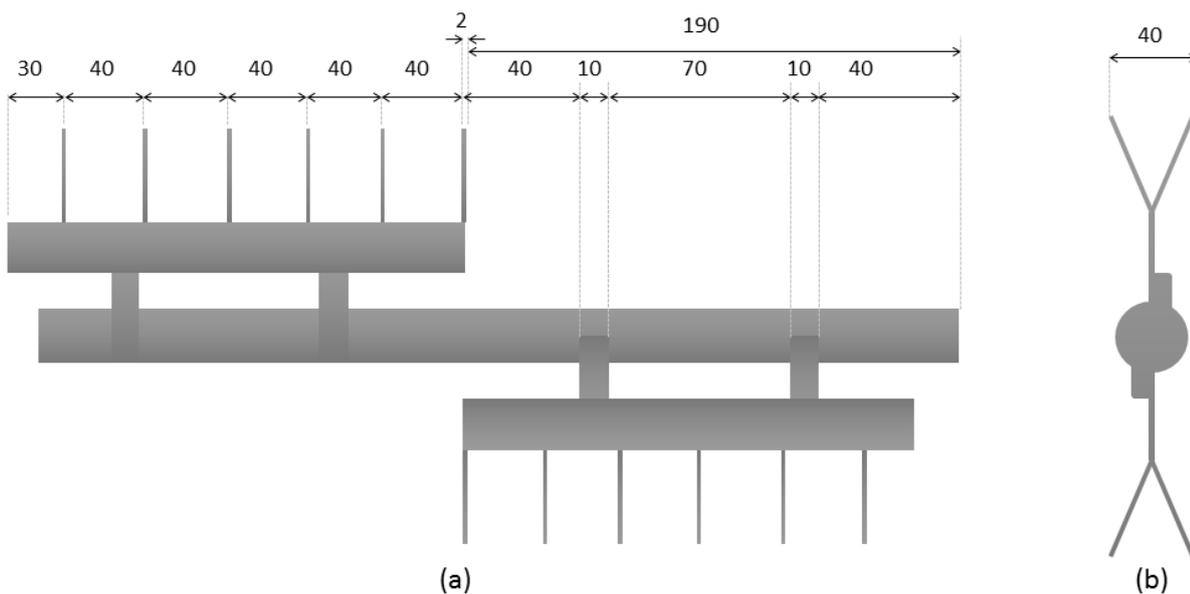
de 80% daquela estimada em um biorreator em colunas. Isso implica que nem toda aglomeração é ruim para o desenvolvimento microbiano.

Figura 2.9: Terceira versão das pás agitadoras. Em (a) tem-se a vista frontal e em (b) a vista lateral.



A Figura 2.9 foi elaborada pelo autor dessa tese.

Figura 2.10: Última versão das pás agitadoras. Em (a) tem-se a vista frontal e em (b) a vista lateral.



A Figura 2.10 foi elaborada pelo autor dessa tese.

Após todos os testes realizados até o momento, concluiu-se que a terceira versão é a mais adequada para ser implementada em biorreatores de maior porte, no entanto, alguns ajustes serão necessários para que o substrato não fique compactado no tubo de fermentação.

2.2.2.2. Controle da Agitação

O sistema de controle da agitação foi constituído de um motor de passo, um *driver* para acionar o motor, uma redução do tipo sem fim, adaptada de um motor de para-brisas de carros. Também foi utilizado um sistema eletrônico para propiciar uma correta transmissão das informações da placa de aquisição de dados NI_USB6229-M da National Instruments para o driver de acionamento do motor. O motor de passos utilizado tinha por especificações: torque de $22N.cm$, ângulo do passo de $1,8^\circ$, consumo de no máximo $3,5A/fase$ e velocidade máxima de 200 RPM. Para o acionamento do mesmo foi utilizado um driver de $1,7A/fase$ com controle de velocidade e sentido da rotação. A escolha por se utilizar um motor de passos e não um motor de corrente contínua se deve ao fato de que as rotações utilizadas nesse trabalho são todas baixas, $0,5 \sim 3,2$ RPM. Motores de corrente contínua não apresentam torque adequado em baixas rotações, por outro lado, os motores de passo perdem eficiência em altas rotações.

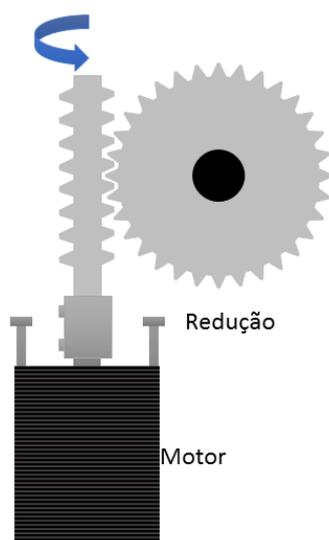
Para facilitar e melhorar a performance do programa elaborado em *Labview™*, o controle da velocidade do motor foi feito utilizando sinais analógicos. Para se transmitir essa informação ao driver foi montado um conversor tensão-frequência (TF) e em sua saída foi utilizado um comparador para garantir os níveis lógicos necessários ao driver. O conversor TF utilizado foi o circuito integrado LM331 e apresentou tensões de saída variando entre 1V e 3,5V para os níveis lógicos 0 e 1, respectivamente. No entanto, o driver recebe sinais do tipo aberto ou fechado, por isso, para garantir esses níveis, foi utilizado um comparador com saída “coletor aberto”, o circuito LM311. Para esse tipo de saída, quando o nível lógico é baixo a saída do circuito integrado é um curto circuito, quando é alta é um circuito aberto.

O uso da redução sem fim de um motor de para-brisa de carros adaptada a um motor de passos foi uma alternativa que melhorou acentuadamente a transferência de torque do motor para as pás agitadoras. Não seria possível utilizar nesse trabalho o motor original devido ao baixo torque em baixas rotações. Por outro lado, no caso de ser necessário se estudar o crescimento microbiano em rotações maiores, o motor original é capaz de entregar torque suficiente para acionar as pás do biorreator, quando que a rotação na saída da redução for maior do que 20 RPM. A Figura 2.11 ilustra o funcionamento da redução do tipo sem fim, na qual o eixo do motor e o eixo das pás estão perpendiculares entre si.

A vida útil da redução utilizada depende basicamente de como o motor de passos está acoplado à redução. Foram desenvolvidas três versões do conjunto, nas quais foram observadas

que a distância do motor para a base da redução deve ser mínima com o mínimo de folgas possíveis entre o eixo do motor e o eixo da redução. Mas ainda assim o mesmo deverá possuir alguma liberdade de movimentos laterais de modo a não sacrificar os rolamentos do acoplamento. A redução possui uma determinada vida útil, visto que é montada em material plástico, mesmo assim, até o momento foram realizadas mais do que 20 fermentações, totalizando mais do que 500 horas de uso contínuo, movimentando massas de meio com cerca de 1,7kg. Portanto, foi uma alternativa financeiramente viável e com vida útil suficiente para executar diversos tipos de planejamentos experimentais.

Figura 2.11: Redução sem fim. As setas em azul indicam os sentidos de giro do motor e do eixo de transmissão das pás agitadoras.



A Figura 2.11 foi elaborada pelo autor dessa tese.

2.2.2.3. Aeração do processo

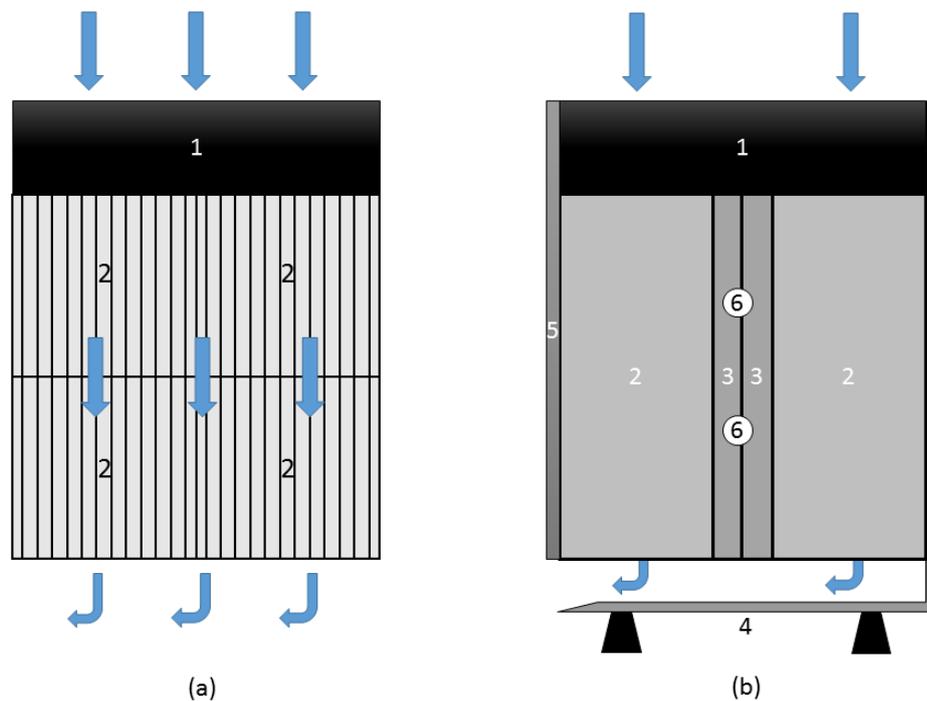
O sistema de aeração foi constituído de um compressor com capacidade de 20L/min, dois controladores de fluxo de massa de 5L/min, modelo GFC 17A da Aalborg, um tubo com sílica para impedir que qualquer fluxo de água condensada pelo compressor chegue aos controladores de fluxo de massa e um umidificador de ar. Além desses componentes, foi adicionado um sensor de temperatura e umidade relativa do ar na entrada de ar do biorreator, modelo GMT 330 da Vaisala, e um sensor do tipo PT 100 para medir a temperatura na saída.

O fluxo de massa foi controlado pela placa de aquisição da National Instruments, uma vez que a saída analógica dessa pode ser ligada diretamente na referência dos controladores. Para tal, foi utilizado um sinal de 0 a 5 V que controla um fluxo de ar variando de 0 a 5LPM.

2.2.3. Controle da temperatura da parede externa do biorreator

O sistema de aquecimento do biorreator foi constituído por uma resistência para aquecimento de fornos eléctricos de 250W, duas placas de alumínio e oito dissipadores para processadores com até 84W. A Figura 2.12 ilustra essa montagem, em (a) tem-se a vista frontal e em (b) a lateral. O ar frio, soprado por um ventilador colocado no alto da peça, é forçado através dos dissipadores e aquecido nesse processo. O ar é então direccionado perpendicularmente pela parte de baixo do biorreator e circulado ao redor deste. O acionamento da resistência foi feito através de um relé de estado sólido, com suporte para 60 A e 250V, que foi acionado directamente por uma saída digital da placa de aquisição de dados utilizada. O ciclo de acionamento da potência foi de 30 segundos e o tempo de acionamento, calculado por um controlador (proporcional-integrativo ou preditivo, conforme estudo realizado) era um determinado percentual desse período. Por exemplo, uma acção de controle de 50% determina que a potência fica ligada por 15 segundo, o que ao longo do ciclo representa 125W dos 250W da mesma. Esse tipo de controle é conhecido como modulado por largura de pulso, também conhecido por PWM (pulse width modulation).

Figura 2.12: Montagem do sistema de aquecimento do biorreator. O sistema foi dividido em: 1- ventilador, 2- dissipadores de aletas, 3- placas de alumínio para suporte da resistência, 4- base e direccionador do fluxo de ar quente, 5- placas de condução lateral do fluxo de ar, 6- resistência eléctrica.



A Figura 2.12 foi elaborada pelo autor dessa tese.

O sistema de refrigeração foi montado conforme a cuba apresentada na Figura 3.1 e o seu acionamento seguiu o princípio do PWM.

2.2.4. Sonda de temperatura

As medidas de temperatura são feitas através de uma sonda, constituída por um sensor do tipo PT100 posicionado na ponta de uma haste de aço inox que é excursionada ao longo do leito do biorreator a cada 15 minutos, aproximadamente. O sensor foi alimentado por uma fonte de corrente de cerca de 3,4 (mA) montada a partir do circuito integrado LM334. O acionamento dessa sonda foi feito por meio de um motor de passos e sua excursão determinada por dois sensores de fim de curso eletromecânicos (SFC). Esses sensores tiveram por objetivo determinar quando o motor deveria cessar seu movimento e quando deveria mudar a direção do movimento, respectivamente a chave de posição inicial e a chave de posição final. Para evitar danos à haste da sonda, a alimentação do *driver* do motor do eixo do biorreator foi conectada à sonda de posição inicial. Esta acionava um relé eletromecânico que impediria o circuito de alimentação do *driver*.

2.2.5. Fotografias do biorreator

A Figura 2.13 é uma fotografia da parte interna do biorreator que mostra a montagem do sistema de pás, aeração e suporte do biorreator. Nessa Figura, as peças brancas são as bases onde fica montado o biorreator, as peças pretas interiores às peças brancas são o suporte do tubo do biorreator, as barras roscadas são as travas que mantêm unidas todas as peças móveis. É possível observar ao lado direito dessa figura, abaixo da placa de alumínio, o motor e a redução que movimentam o eixo das pás agitadoras. Desse mesmo lado estão os pés (dois na parte de cima e um na de baixo) que sustentam o biorreator em posição de alimentação (vertical). Ao lado esquerdo encontra-se o mecanismo de suporte da sonda de temperatura.

A Figura 2.14 mostra a montagem da sonda de temperatura. Nessa figura é possível ver o motor de passo que movimenta a sonda montado do lado esquerdo, o suporte montado em peças de alumínio ao redor da haste que movimenta a sonda, a fiação eletrônica dos sensores. O tubo azul foi utilizado para evitar o rompimento dos cabos do sensor de temperatura da sonda durante sua movimentação. Esse tubo foi escolhido devido ao compromisso que apresentou

entre maleabilidade e curvatura das dobras, o que impede movimentos acentuados do cabeamento da sonda. É possível observar também um furo na lateral da base do biorreator, que é utilizado para recolhimento de amostras do material fermentado quando necessário.

Figura 2.13: Fotografia da vista lateral do biorreator.



Figura 2.14: Montagem da sonda de temperatura.



A Figura 2.15 mostra a montagem do biorreator em posição operacional (vista lateral) e a Figura 2.16 mostra a visão superior de todas partes em posição de funcionamento. Na Figura 2.15, no canto inferior direito vê-se a caixa montada em alumínio onde fica embarcada toda a eletrônica do biorreator e o cabeamento que atua no mesmo, e em cima desta, o monitor para

visualização das informações importantes do processo. Montado na frente da caixa de policarbonato transparente encontra-se um dos ventiladores responsáveis pela refrigeração do processo. A espuma colocada nesse serve para impedir que o ar quente saia do interior da cuba, mas não impede a passagem forçada do ar frio do exterior.

Figura 2.15: Montagem do biorreator em posição operacional, vista lateral.

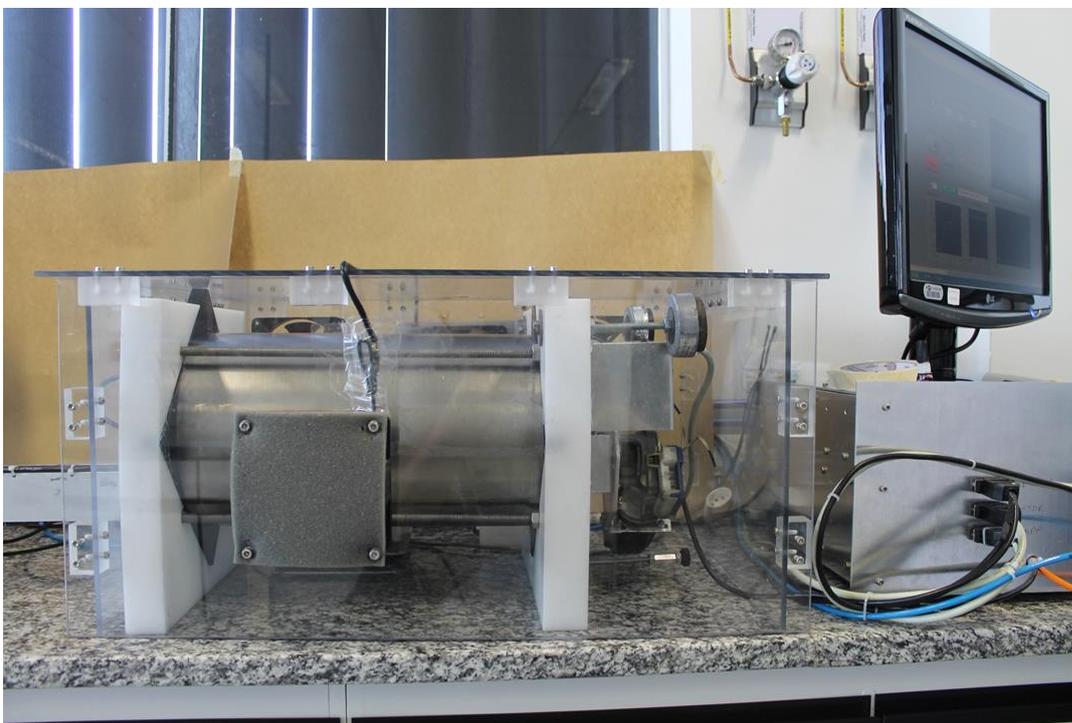
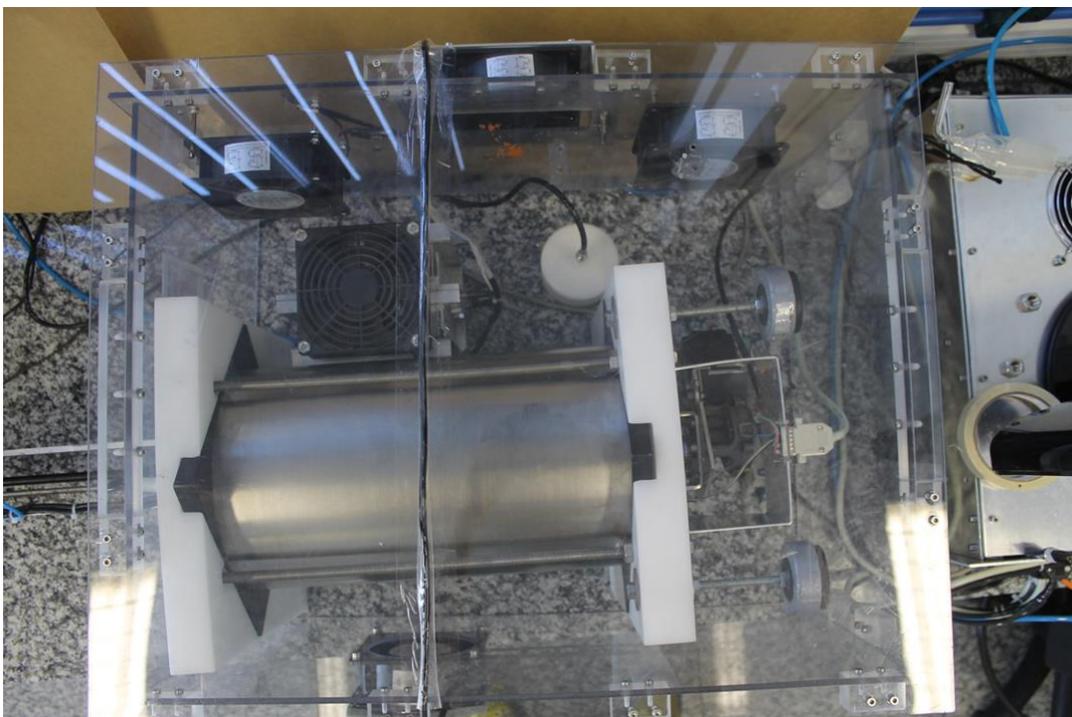


Figura 2.16: Montagem do biorreator em posição operacional, vista superior.



Na Figura 2.16, é possível comparar o posicionamento das peças descritas na Figura 2.4. Nas paredes laterais da cuba se encontram os ventiladores para homogeneizar a temperatura interior e os de refrigeração que se encontram no centro. A peça circular construída em poliacetal branco disposta na parte superior da figura, mas no interior da cuba, é o suporte do sensor de umidade relativa e temperatura do ar que alimenta o biorreator. O objeto à sua esquerda é o aquecedor do processo, no qual a peça preta em cima da montagem de alumínio é o ventilador que força a circulação de ar pelo bloco aquecido. O cabo preto montado na face superior da cuba serve para acionamento dos ventiladores de refrigeração.

2.3. INSTRUMENTAÇÃO VIRTUAL PARA AUTOMAÇÃO DO BIORREATOR

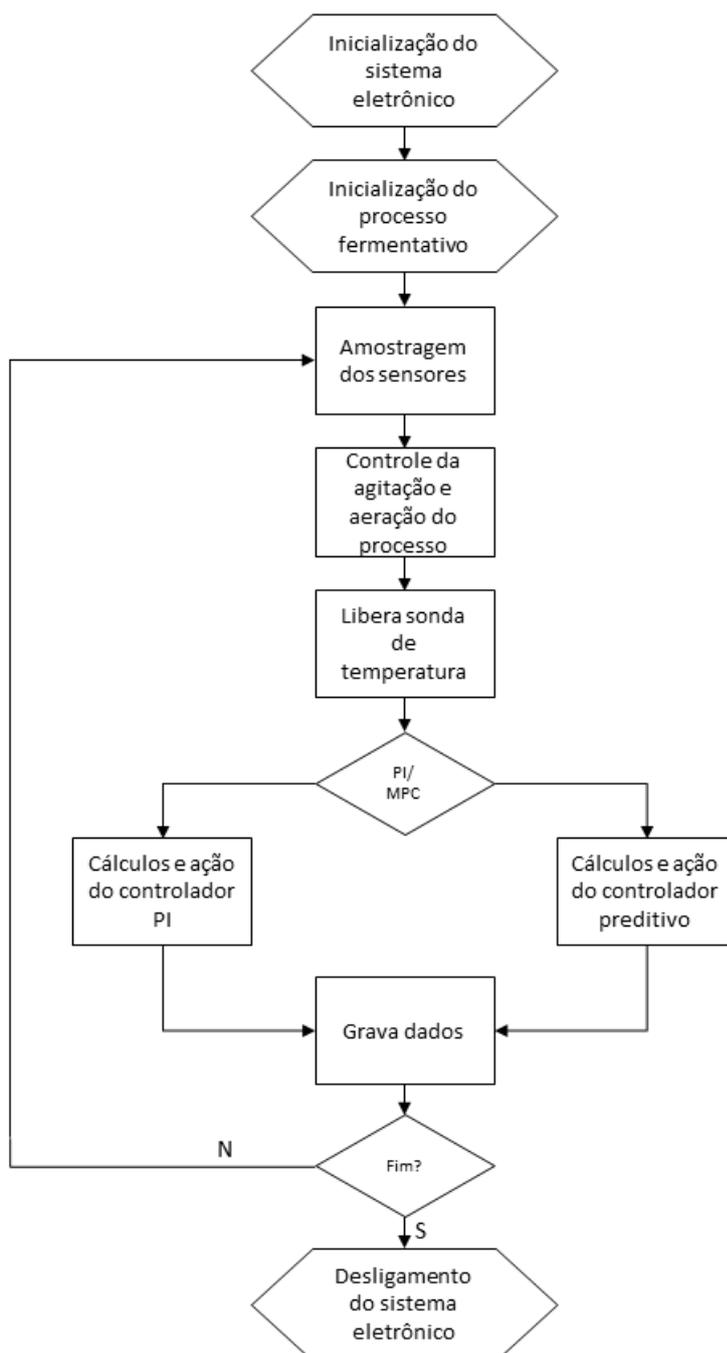
O programa que automatiza a maioria das funções do biorreator foi desenvolvido na plataforma de programação gráfica *Labview*TM versão 8.2. Uma das grandes vantagens do uso desse *software* é a integração entre um computador pessoal e a instrumentação do equipamento desenvolvido. A compilação dos programas desenvolvidos em *Labview*TM é baseada em objetos, ou módulos de execução. A vantagem desse tipo de programação é a execução paralela das rotinas do processo, se foram programadas para isso. A comunicação entre a instrumentação virtual e a eletrônica que atua no biorreator foi feita através de uma placa de aquisição de dados da *National Instruments* modelo NI-USB-6229M. Essa placa tem por função adquirir e enviar sinais analógicos e digitais da instrumentação utilizada.

Nesse trabalho, devido às restrições do computador utilizado, Core 2 Duo E7200 @ 2,53GHz, foi priorizada uma rotina sequencial com intervalo entre ciclos de 0,5 segundos. Um segundo motivo para o uso de uma rotina sequencial foi para que rotinas de leitura e gravação de dados distintas chamassem a placa de aquisição uma de cada vez, evitando congestionamento de dados e possíveis falhas na comunicação via porta USB. A Figura 2.16 mostra a rotina utilizada.

Duas funções não fizeram parte do ciclo do programa: a rotina da sonda (movimento, sentido, leitura dos sensores de fim de curso) e a rotina do controlador preditivo (solução de equações diferenciais ordinárias (EDO's) e cálculos de controle). Para a primeira foi testada uma rotina em que o *Labview* controlava diretamente a velocidade do motor de passos, tanto da sonda quanto do eixo. Porém, esse tipo de rotina consumia muito tempo computacional,

deixando outras funções igualmente importantes atrasadas e aumentando consideravelmente o tempo de execução do ciclo, cerca de 3 segundos. Por isso, foi decidido executar eletronicamente essa rotina, conforme descrito no tópico 2.2.2. No caso do controlador preditivo, o motivo é semelhante, pois a resolução da EDO's leva entre 2 a 3 segundos, gerando atrasos no ciclo principal. No entanto, no caso do controlador preditivo, esse ciclo é executado a cada amostragem da temperatura do meio, sendo, portanto, muito menos impactante no tempo de execução do programa que o controle dos motores de passo.

Figura 2.17: Fluxograma do programa que automatiza o biorreator.



A Figura 2.16 foi elaborada pelo autor dessa tese.

Atrelada à rotina da sonda está a rotina de leitura dos sensores de fim de curso. Essa última foi implementada de modo que a cada novo bloco de instruções a mesma fosse chamada de modo a diminuir o tempo entre o acionamento do SFC e a mudança de direção ou parada da sonda. Foi constatado que quanto maior o tempo entre essas ações, maior a chance de falha na movimentação da mesma. Os estados dos SFC's são avaliados por mudança de nível. Essa escolha se deve aos ruídos observados nesse sensor. Para se garantir uma boa medida, o sensor é reconhecido como acionado quando as seis últimas amostras do sensor apresentem nível lógico alto. Esse tipo de abordagem funciona como um filtro para evitar falsos positivos do sensor, garantindo que o mesmo se encontra no nível lógico requerido.

Para que a sonda possa ser movimentada são necessárias duas ocorrências: 1- tempo desde a última amostragem maior do que 15 minutos e 2- eixo de agitação das pás estar em posição que deixa o caminho da sonda livre. Durante a movimentação dessa, o programa observa se o SFC que limita a excursão foi acionado. Até que seja acionado, a sonda movimenta-se em sua direção, então o sentido do movimento é mudado. Para evitar erros de leitura, uma vez acionado esse SFC, seu estado é virtualmente mantido pelos próximos 2 segundos, de modo a garantir que a sonda já esteja a caminho do SFC da posição inicial. Ao alcançar esse último sensor, um sinal é enviado para que seu movimento seja cessado.

O programa, esquematizado pelo fluxograma da Figura 2.16, é dividido em sub-rotinas para facilitar sua implementação. Sub-rotinas são funções dentro do programa principal que executam tarefas específicas, como leitura e gravação de dados, cálculos específicos, entre outros. Essas sub-rotinas podem ser descritas no corpo do programa principal ou em subVI's conforme a complexidade da programação necessária para executar uma função específica. SubVI é uma nomenclatura do *Labview* para um objeto com função de auxiliar o programa principal. O principal objetivo destes é a simplificação da visualização do código dado o número de operações necessárias para ser executado. Uma vez dividido em partes menores, o programa pode ser mais facilmente entendido. As rotinas e sub-rotinas do programa foram divididas em:

1. Inicialização da Eletrônica

1.1. Garantir que a sonda estivesse em sua posição inicial.

1.2. Garantir que todos os atuadores estão desligados

1.2.1. Driver da sonda

1.2.2. Driver do motor do eixo

- 1.2.3. Velocidade dos motores
- 1.2.4. Aquecedor do processo
- 1.2.5. Ventiladores de refrigeração
- 1.2.6. Controladores de fluxo de massa

2. Inicialização do processo fermentativo

Garantir uma boa mistura entre solução de esporos e o substrato através de uma agitação constante, alternando-se o sentido de rotação, por 50 voltas seguidas a 3 RPM.

- 3. Aquisição de dados e plotagem dos gráficos e indicadores do processo
- 4. Atuação no aquecimento do processo
- 5. Controle da agitação do processo
- 6. Controle da aeração do processo
- 7. Aquisição de dados pela sonda de temperatura (amostragem realizada a cada 15 minutos)
 - 7.1. Aquisição de dados
 - 7.2. Montagem de histograma e preparação dos dados para gravação
- 8. Atribuição de valores para as variáveis globais do processo (dados relevantes para o controlador preditivo)
- 9. Leitura de dados sobre referência de controle
- 10. Escolha entre controlador PI ou Preditivo
- 11. Gravação dos dados do processo em disco rígido (a cada 60 segundos)
- 12. Se finaliza o processo segue para 13, senão volta para 3
- 13. Finalização do processo e da eletrônica
 - 13.1. Idem ao item 2, para garantir o desligamento do sistema.

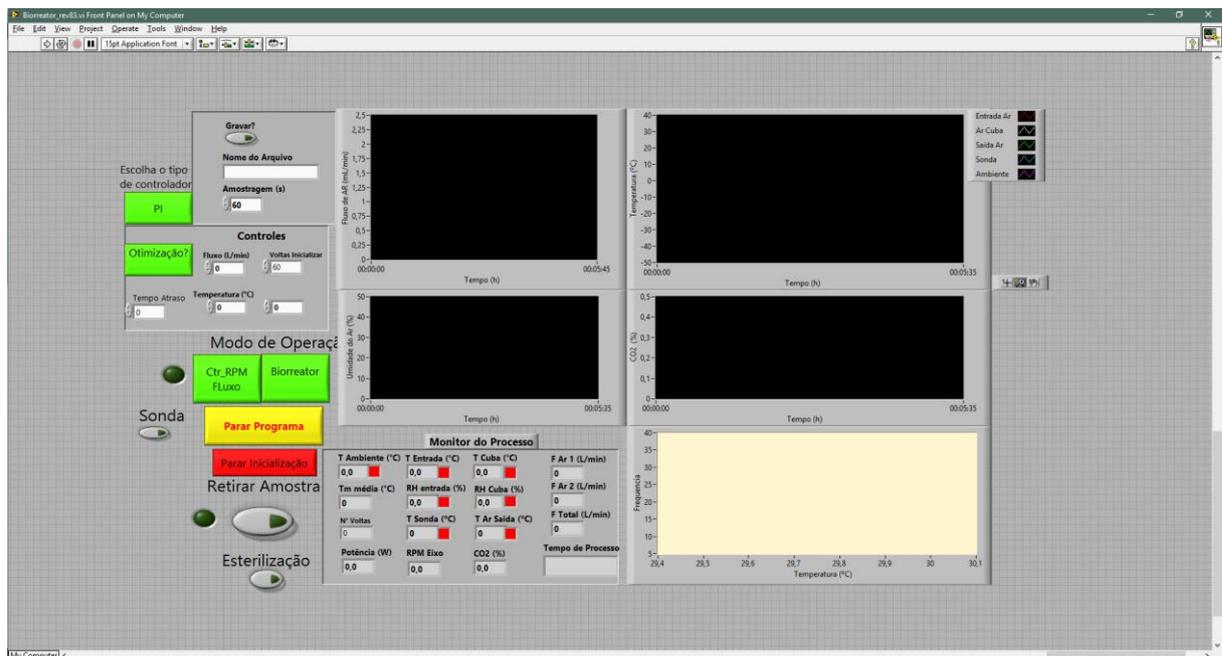
As Figuras 2.17 a 2.22 ilustram como é feita a programação em Labview. Na Figura 2.17 é mostrado o painel frontal do instrumento virtual. Nesse, são mostrados os dados de temperatura do processo, temperatura do ar que alimenta o biorreator, do ar que sai do biorreator, do ar no interior da cuba, a umidade relativa do ar na entrada do biorreator, a velocidade de agitação do processo e a taxa de aeração. Também se encontram opções de

controlador e modo de operação, gravação dos dados e referência de temperatura para o processo. A Figura 2.18 ilustra como foi feita parte da inicialização do biorreator, quando o instrumento virtual é ligado.

A Figura 2.19 mostra a chamada da sub-rotina que controla a evolução da sonda de temperatura, retângulo amarelo com escritos colorido no centro da figura. A Figura 2.20 mostra os fluxos de dados do subVI que operacionaliza a sonda de temperatura. Nessa figura também é mostrada a sub-rotina que auxilia no gerenciamento de falhas na comunicação USB entre a placa de aquisição de dados e o computador utilizado. Para que não haja falhas, essa sub-rotina deve ser colocada na saída de todo instrumento virtual que realiza alguma comunicação via USB.

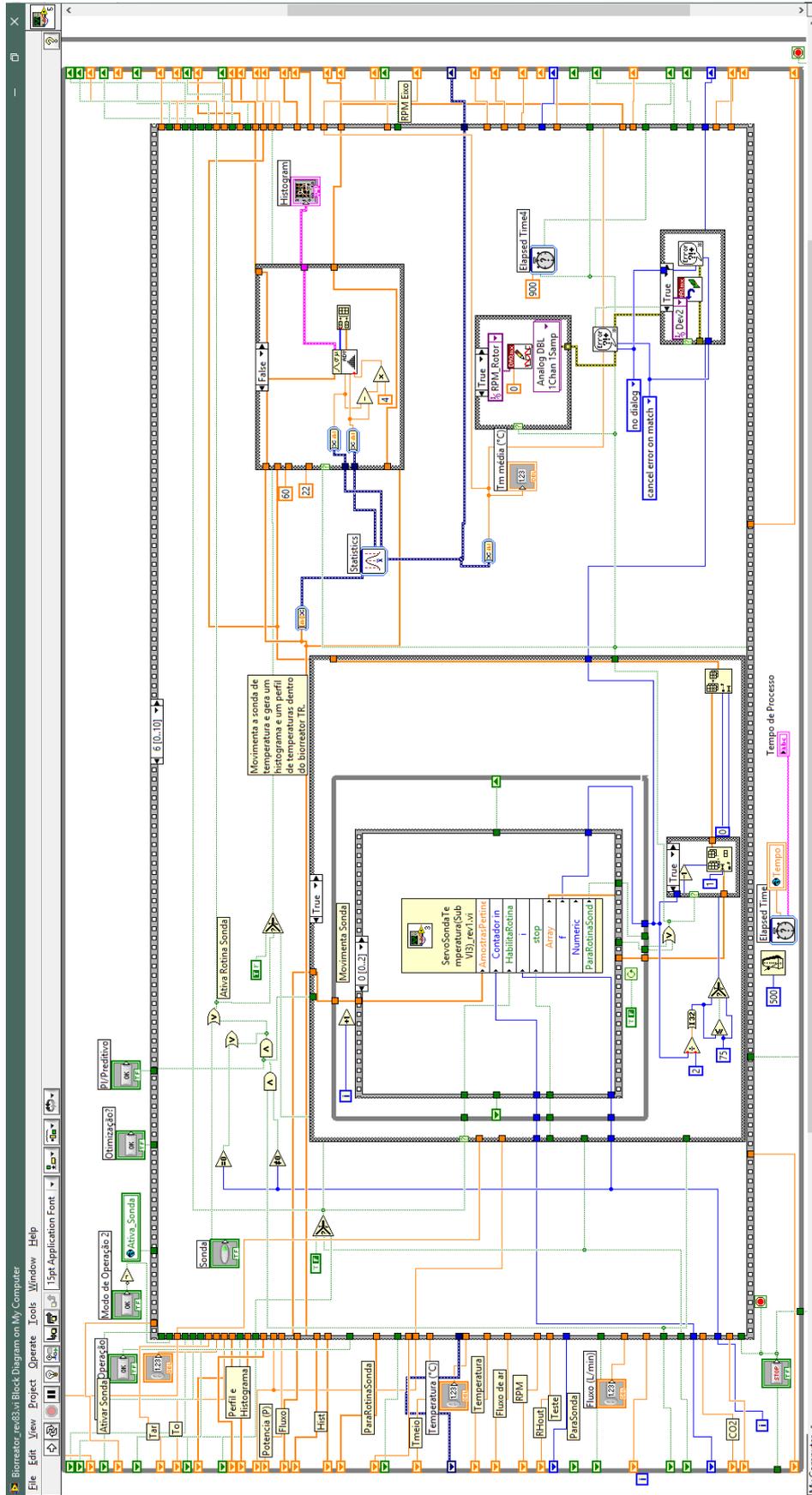
Na Figura 2.21 destaca-se o uso de um controlador PI, com seus parâmetros e limites definidos através das entradas do mesmo. Já na Figura 2.18 é mostrado o instrumento virtual responsável pela execução do controlador preditivo. Nesse são mostradas as variáveis globais, destacadas em laranja e em verde do lado esquerdo da figura, e também, o script que executa o modelo do biorreator e do processo fermentativo, assim como os cálculos do controlador. Através de outra variável global, a informação da potência que aquecerá o processo é transmitida ao programa principal.

Figura 2.18: Painel frontal do programa que opera o biorreator.



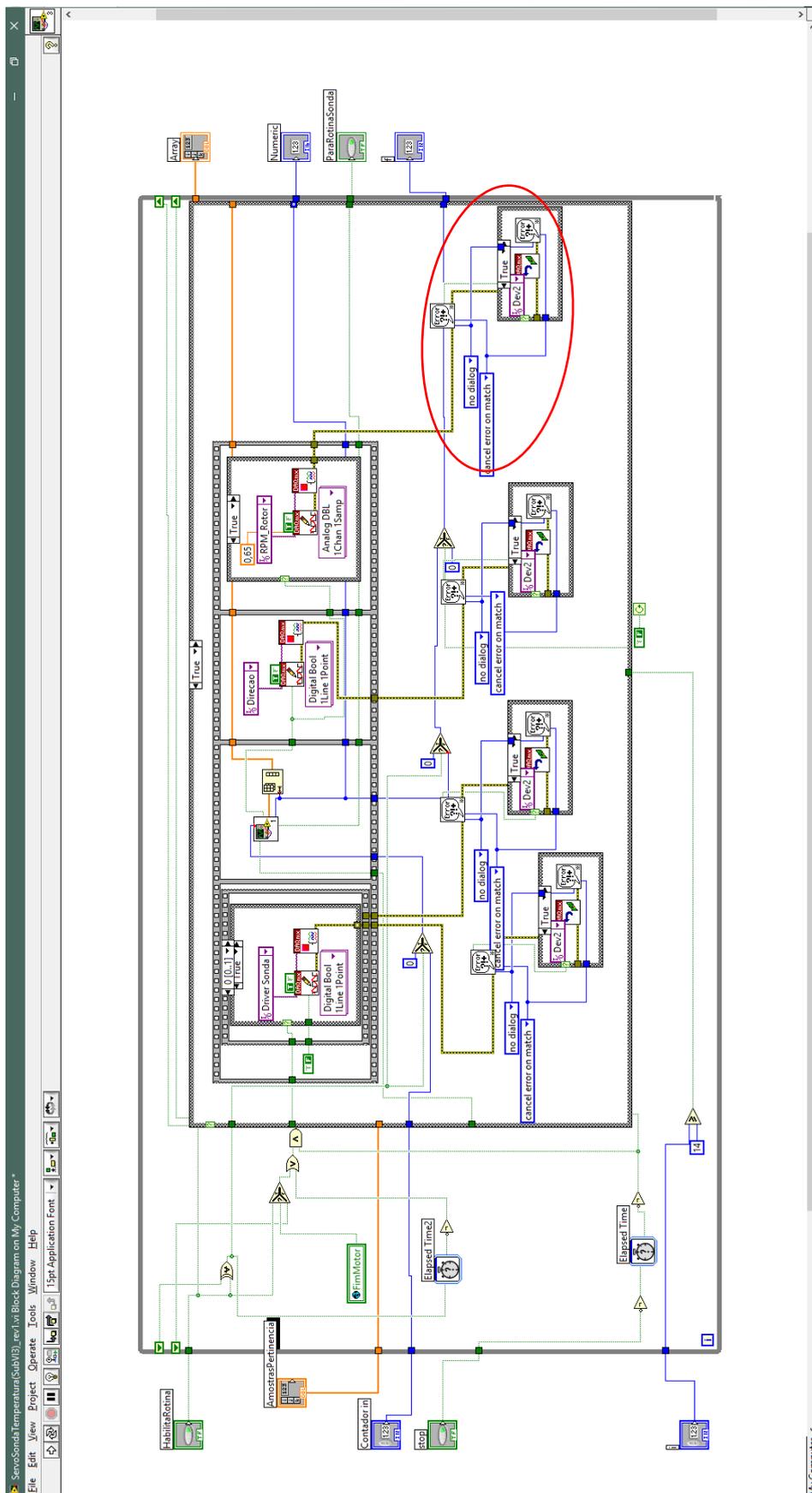
A Figura 2.14 foi elaborada pelo autor dessa tese.

Figura 2.20: Chamada de um *subVI* (*virtual instrument*) para operacionalizar a sonda.



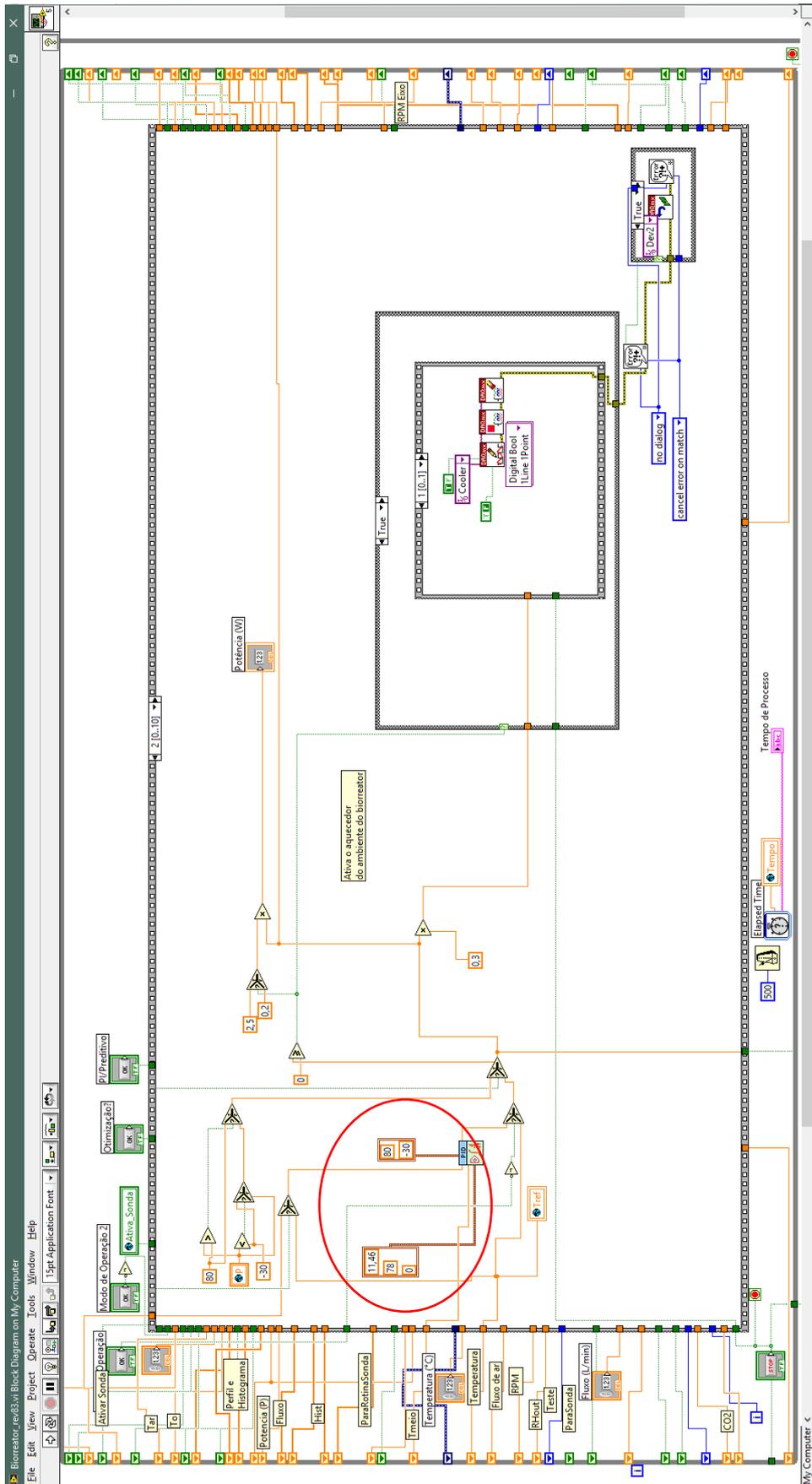
A Figura 2.19 foi elaborada pelo autor dessa tese.

Figura 2.21: SubVI (virtual instrument) que operacionaliza a sonda.



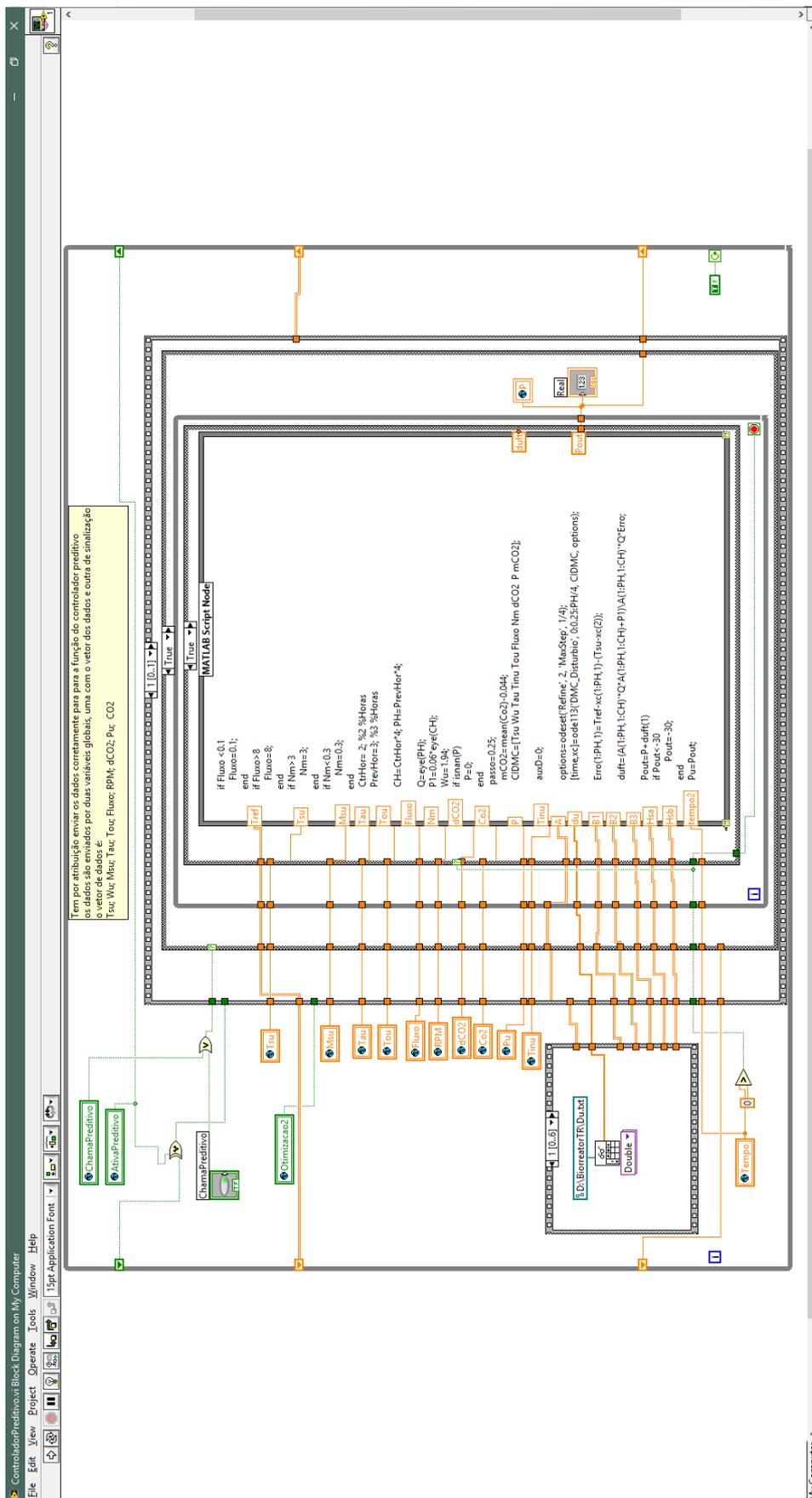
A Figura 2.20 foi elaborada pelo autor dessa tese.

Figura 2.22: SubVI de um controlador PI no Labview.



A Figura 2.21 foi elaborada pelo autor dessa tese.

Figura 2.23: Instrumento virtual que roda o controlador preditivo.



A Figura 2.22 foi elaborada pelo autor dessa tese.

2.4. DISCUSSÕES

Está foi a etapa mais demorada de todo o desenvolvimento do trabalho desta tese. Inicialmente era previsto que a conclusão do desenvolvimento do biorreator ocorresse com 18 meses do início da etapa, porém foram necessários 30 meses. Os principais motivos para esses atrasos foram:

- Desenvolvimento de todas as rotinas de segurança
 - Essas rotinas estão divididas entre software, eletrônica e mecânicas. As duas principais foram: 1- impedir que as pás se movimentassem enquanto a sonda não estivesse em sua posição inicial; 2- rotina de gerenciamento de falhas na comunicação USB. À essa segunda devem ser adicionados os dois meses necessários para se descobrir que a porta USB do computador que estava sendo utilizado estava com problemas. O problema foi solucionado com a troca de computador.
- Tubo de vidro utilizado para conter o processo fermentativo
 - No início do desenvolvimento, o tambor de fermentação era composto por um tubo de vidro, porém um primeiro tubo não aguentou as pressões exercidas em suas paredes durante as fases de aquecimento para testes de transferência de calor do meio externo para o meio interno. Um segundo tubo de vidro foi quebrado durante uma manutenção. Devido a isso, foram necessária várias adaptações para que a base recebesse um tubo de aço inox com diâmetro de 1 cm maior do que o de vidro. Com isso, todos os testes de transferência de calor tiveram de ser refeitos.
- Eletrônica e acabamento do produto
 - Durante o desenvolvimento da eletrônica do biorreator foram utilizadas placas universais para acomodar os componentes eletrônicos. Porém, essa abordagem só se mostrou útil durante a fase inicial, pois resultaram dessa inúmeros ruídos que prejudicavam demasiadamente as medidas do processo. Por esse motivo, foi necessário que toda a parte eletrônica do processo fosse colocada em circuitos impressos apropriados dentro de uma caixa construída especificamente para isso. Não haviam caixas no mercado cujo tamanho fosse suficiente para acomodar todos os

componentes, drivers, fontes e a placa de aquisição de dados em um único invólucro.

- Programação em Labview.
 - A elaboração de um programa com tantas sub-rotinas e tantas restrições lógicas se mostrou um desafio maior do que o esperado. Isso, aliado à inexperiência na concepção de um produto por parte do autor, resultou em um longo tempo para o completo desenvolvimento da automação do processo.

2.5. CONCLUSÕES

Apesar de todos os percalços do caminho, o desenvolvimento do biorreator foi bem-sucedido. Todos os requisitos estabelecidos no início do projeto foram completados, com o biorreator fazendo exatamente aquilo que foi programado. Salienta-se também, que, no desenvolvimento de um produto são necessários muitos testes para que o mesmo funcione apropriadamente. No caso de um biorreator de fermentação em estado sólido, essa fase de depuração e eliminação de falhas do equipamento é bastante demorada, pois os erros podem aparecer logo após inicializar o programa, ou dois dias depois. Isso depende do tipo de falha que o problema aparente está associado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHEN, H.; HE, Q. A novel structured bioreactor for solid-state fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 2, p. 223-230, Feb 2013. ISSN 1615-7591. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000314269900010 >.
- DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 113-125, Mar 2003. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000180950500005 >.
- GASIOREK, E. Effect of operating conditions on biomass growth during citric acid production by solid-state fermentation. **Chemical Papers**, v. 62, n. 2, p. 141-146, Apr 2008. ISSN 0366-6352. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000253753700003 >.
- HE, Q.; CHEN, H. Pilot-Scale Gas Double-Dynamic Solid-State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 10, p. 2916-2924, Oct 2013. ISSN 1935-5130. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000323881800032 >.
- MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. **Solid-State Fermentation Bioreactors**. Springer-Verlag, 2006. 480p.
- STUART, D. M. et al. Solid-state fermentation in rotating drum bioreactors: Operating variables affect performance through their effects on transport phenomena. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, n. 4, p. 383-391, May 20 1999. ISSN 0006-3592. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000079313700001 >.
- WEBER, F. J.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. A simplified material and energy balance approach for process development and scale-up of *Coniothyrium minitans* conidia production by solid-state cultivation in a packed-bed reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 65, n. 4, p. 447-458, Nov 20 1999. ISSN 0006-3592. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000083078500009 >.

3. MODELAGEM DE UM PROCESSO DE FES EM AMPLA FAIXA OPERACIONAL COM APLICAÇÃO NA OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO.

3.1. INTRODUÇÃO

A Fermentação em Estado Sólido (FES) pode ser descrita pela cultura de microrganismos em ambientes caracterizados pela ausência ou quase ausência de água livre no processo. Com essa característica, resíduos agroindustriais como o bagaço de cana, palha de soja, milho e trigo podem ser utilizados diretamente como suporte para o crescimento microbiano e, conseqüentemente, para a formação de produtos desejados, tais como enzimas e ácidos orgânicos (Gasiorek, 2008; De Castro *et al.*, 2015; El-Bakry *et al.*, 2015). A FES quando comparada com a Fermentação Submersa (FS), apresenta maior produtividade, menor repressão catabólica e menores custos operacionais. Esse último é devido ao fato de que os próprios resíduos agroindustriais utilizados podem servir como fonte de nutrientes para o crescimento microbiano. Por outro lado, as maiores dificuldades para implementação de FES em aplicações industriais são as dificuldades de controle das variáveis do processo, monitoramento e manutenção da temperatura e da umidade do meio (Hamidi-Esfahani *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2006). Por esses motivos, o conhecimento de como o microrganismo cresce e produz os metabólitos de interesse em uma ampla faixa de condições operacionais é fundamental para o desenvolvimento da FES em biorreatores de maior porte.

O processo de formação de produtos de interesse possui uma determinada dinâmica, a qual está relacionada com o crescimento microbiano e, por sua vez, é influenciado pelas condições ambientais do meio (Sargantanis *et al.*, 1993; Smits *et al.*, 1998). Conseqüentemente, é essencial para a modelagem e otimização do processo o conhecimento dos efeitos das condições ambientais no processo. Além disso, o tempo da batelada está atrelado à cinética de formação dos produtos, no qual inclui-se também o período de manutenção e limpeza do biorreator, assim como o início do novo cultivo (Sargantanis *et al.*, 1993; Szewczyk e Myszka, 1994; Smits *et al.*, 1998; Hamidi-Esfahani *et al.*, 2004; Rodríguez-Fernández *et al.*, 2011).

A estimativa dos parâmetros de crescimento pode ser feita através da evolução do perfil da produção de CO_2 durante o processo (Rodríguez-Fernández *et al.*, 2011). Desse modo, havendo um modelo para o crescimento microbiano, a partir da análise dos metabólitos de

interesse é possível descrever um mecanismo para a formação desses produtos. Além disso, havendo um planejamento experimental para as condições ambientais estudadas, cada um dos parâmetros do modelo poderá ser representado por uma função matemática (Gelmi *et al.*, 2002; Hamidi-Esfahani *et al.*, 2004; Lekanda e Perez-Correa, 2004; Dalsenter *et al.*, 2005).

A Metodologia da Superfície de Resposta (RSM) é uma metodologia amplamente utilizada a fim de se otimizar os produtos de um processo (Singh *et al.*, 2005). Quando associada a um planejamento experimental, é possível se obter uma superfície polinomial que indica qual a melhor condição operacional do processo sem desenvolver um modelo matemático do processo. Por outro lado, através de um modelo adequadamente ajustado é possível analisar o processo em condições não estudadas, estimando-se os resultados, em geral, com precisão maior do que aquela da RSM. Mais ainda, é possível utilizar algoritmos de otimização para avaliar o quanto as variações das condições ambientais ao longo do processo podem influenciar positivamente na formação dos produtos de interesse.

Outro método de se otimizar um processo é através do uso de operações evolucionárias que são conhecidas pela aplicação de um planejamento experimental sequencial, no qual algumas variáveis são analisadas ao fim do processo. No final da primeira rodada de experimentos, avalia-se quais foram as condições experimentais que resultaram nos maiores valores para variáveis escolhidas. Realiza-se então uma nova rodada de experimentos, cujo planejamento experimental é ditado pelos resultados da rodada anterior. O procedimento é repetido até que as diferenças entre a penúltima e última rodadas não sejam mais significativas (Costa e Oliveira, 2001; Banerjee e Bhattacharyya, 2003; Kumar *et al.*, 2011).

Portanto, os objetivos desse trabalho foram: 1- relacionar a respiração microbiana com o seu crescimento e esse último com a formação dos produtos de interesse em diversas condições ambientais, determinadas por um planejamento experimental e descritas através de um modelo matemático; 2- utilizar um algoritmo iterativo, baseado em programação não linear com variáveis inteiras para se obter, computacionalmente, um perfil de temperatura afim de aumentar a produção de enzimas quando comparado aos resultados da RSM e da resposta do modelo com temperatura constante; 3- Reavaliar progressivamente se o modelo assumido representa satisfatoriamente as observações experimentais do perfil proposto. Caso necessário, atualizar o modelo e repetir os passo 2 e 3. Tais procedimentos tiveram como fonte de estudo um processo de formação de celulasas a partir da fermentação em estado sólido utilizando-se farelo de trigo como substrato e a cepa do *Aspergillus niger 3T5B8* como agente produtor.

Todos os experimentos foram realizados em um biorreator de colunas instrumentado (Farinas, C. S. *et al.*, 2011).

3.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.2.1. Fermentação em estado sólido

O fungo utilizado foi o *Aspergillus niger* (3T5B8), um mutante morfológico da coleção da Tecnologia de Alimentos da Embrapa (Couri e Defarias, 1995). A cultura foi mantida em tubos em meio PDA a temperatura ambiente, sob fina camada de óleo mineral. A FES foi conduzida em um biorreator de colunas controlado (Farinas, C. S. *et al.*, 2011) com aproximadamente 5 g de farelo de trigo por coluna. Esse reator possui um sistema de monitoramento e aquisição do CO₂ produzido durante o cultivo, controle de temperatura ambiente, fluxo e umidade relativa do ar. Após a inoculação dos esporos (10⁷ esporos/g) foi adicionado uma quantidade sempre fixa de solução nutriente de Sulfato de Amônio 0,91% em HCl 0,1 M com diferentes volumes de água para obtenção de umidade inicial do substrato conforme o planejamento no item 3.2.4. A vazão de ar utilizada foi de aproximadamente 20 mL/min e a umidade do ar de 80%. A incubação foi feita nas condições da Tabela 1, por 72h, com amostras a cada 24 horas. Os experimentos foram realizados por Caio Borba Melo, Beatriz Pecoraro Sanchez, respectivamente os ensaios de 1 a 11 e 12 a 23 da Tabela 3.1.

3.2.2. Análise Respirométrica

O biorreator de colunas instrumentado utilizado nesse trabalho também conta com um par de sensores de CO₂, GMM220 da Vaisala, Finland, com capacidade de medições entre 0 e 5% (v_{CO_2}/v_{ar}) com erro de 1,5% do fundo de escala. Uma vez que a medida desse sensor é feita em volume de CO₂, para adequá-la à estequiometria da respiração microbiana em mols por grama de substrato, a Equação (3.1) foi utilizada. Todas as análises de crescimento foram realizadas nessa unidade.

$$CO_2 \left(\frac{mol}{g_s} \right) = CO_{2m}(\%) \frac{1}{100\%} F \left(\frac{L}{min} \right) 60(min) \rho \left(\frac{g}{L} \right) \cdot \frac{1}{MM_{CO_2}} \left(\frac{mol}{g} \right) \cdot \frac{1}{M_s} \quad (3.1)$$

Onde F é o fluxo de ar que alimenta cada coluna, 20mL/min; ρ é a densidade do CO_2 , 1,977/g/L; MM_{CO_2} a massa molar do CO_2 , 44,1g/mol e MS é a massa de substrato em cada coluna, 5g.

3.2.3. Extração das Enzimas

Após o período de cultivo, foi adicionado ao material fermentado tampão acetato de sódio 50mM, pH 4,8 na relação de 1:10 (m/v), sendo homogeneizado e posteriormente agitado por 30 min, a 200 rpm. O material foi então filtrado e centrifugado a 10000 rpm durante 15 min, a 4°C, e o sobrenadante utilizado como solução enzimática bruta.

3.2.4. Análise das Atividades Enzimáticas

A atividade da xilanase foi medida em mistura de reação contendo 1 mL de extrato enzimático, diluído em 20 vezes, e 2 mL de solução de xilana 1% em tampão acetato 0,2 M e pH 5,0. Após incubação a 50 °C por 30 minutos, os açúcares redutores foram quantificados pelo método DNS (Miller, 1959). Procedimento semelhante foi utilizado para a atividade de CMCase, onde o substrato utilizado foi 1 mL de solução 4% de CMC em tampão citrato de sódio 50mM e pH 4,8, o tempo de incubação foi de 10 minutos e o extrato enzimático foi diluído em cinco vezes.

3.2.5. Planejamento Experimental

Em estudos anteriores foram avaliados os efeitos do fluxo e da umidade relativa do ar no processo (Farinas, C. *et al.*, 2011), por conseguinte, a umidade relativa do ar nesse trabalho foi fixada em 80% e o fluxo em 20mL/min ou 1 vvm, pois foram as condições que resultaram na maior produção de endoglucanase. Consoante ao primeiro objetivo desse trabalho, os experimentos realizados estão descritos na Tabela 3.1, de modo a se compreender os efeitos da temperatura associados às variações da umidade inicial do meio na produção de celulases. Os ensaios de 1 a 11 fazem parte do planejamento experimental inicial, a sequência apresentada não é a mesma em que foram realizados. Os ensaios 12 e 13 e os 17 e 18 foram conduzidos com

o objetivo de aprimorar o conhecimento dos efeitos dos fatores estudados na produção de celulases, conforme destacado no 3º objetivo do trabalho.

Tabela 3.1: Experimentos realizados.

<i>Ensaio</i>	Umidade inicial do substrato		Temperatura	
<i>1</i>	-1	40%	-1	31°C
<i>2</i>	-1	40%	+1	43°C
<i>3</i>	+1	62%	-1	31°C
<i>4</i>	+1	62%	+1	43°C
<i>5</i>	-1,4142	36%	0	37°C
<i>6</i>	+1,4142	66%	0	37°C
<i>7</i>	0	51%	-1,4142	28°C
<i>8</i>	0	51%	+1,4142	46°C
<i>9</i>	0	51%	0	37°C
<i>10</i>	0	51%	0	37°C
<i>11</i>	0	51%	0	37°C
<i>12*</i>	+0,81	60%	+0,5	40°C
<i>13*</i>	+0,81	60%	-0,5	34°C
<i>14**</i>	+0,81	60%	-	variável
<i>15**</i>	+1,41	66%	-	variável
<i>16</i>	+1,41	66%	+0,5	40°C
<i>17*</i>	+1,41	66%	-1,1	30°C
<i>18*</i>	+1,41	66%	-1,5	27°C
<i>19**</i>	+1,41	66%	-	variável
<i>20***</i>	+1,41	66%	-0,5	34°C
<i>21***</i>	+1,41	66%	-0,5	34°C
<i>22***</i>	+1,41	66%	-	variável
<i>23***</i>	+1,41	66%	-	variável

*Experimentos realizados para aprimoramento do modelo utilizado.

**Experimentos realizados para validação dos aprimoramentos do modelo.

***Experimentos realizados para validação do modelo final.

Os experimentos com temperatura constante 16, 17, 20 e 21 foram avaliados em 42 horas com o objetivo de se comparar a produção dos experimentos 19, 22 e 23 com temperaturas

variáveis, também com 42 horas. Os perfis de temperatura dos experimentos 19, 22 e 23 foram diferentes, conforme descrito na seção 3.3.2. Os ensaios 20 e 21, assim como os ensaios 22 e 23 foram realizados em duplicatas reais para aferir o intervalo de confiança do crescimento microbiano e formação de produtos calculado na modelagem matemática.

3.3. MODELAGEM MATEMÁTICA

3.3.1. Modelo Proposto

O modelo matemático utilizado nesse trabalho teve por objetivo descrever o crescimento microbiano e, associado a esse, a produção enzimática. Para isso, foi utilizada uma associação de equações logísticas que descreveram a evolução da respiração microbiana, descrita pelas medidas de CO₂ realizadas em tempo real durante os experimentos. Foi assumido para o modelo utilizado que o processo pode ser descrito em três fases distintas. O uso de funções logísticas teve por objetivo evitar a existência de descontinuidades no processo de integração numérica, o que poderia levar a resultados inesperados, devido à inter-relação entre as equações empregadas. Além disso, através do uso de expressões logísticas é possível descrever tanto a velocidade de crescimento microbiano, quanto a biomassa viável presente em um determinado processo (Mitchell *et al.*, 2006).

A primeira fase assumida foi a fase de adaptação celular (fase *lag*) ao meio de cultivo. Essa teve por objetivo determinar gradualmente o número de células viáveis no início do processo. A abordagem foi uma adaptação da apresentada por (Dalsenter *et al.*, 2005) e é descrita pela Equação (3.2) para o crescimento primário e pela Equação (3.3) para o crescimento secundário. Os valores de F (adimensional) variaram entre 0,001 e 1 conforme a evolução da acomodação do microrganismo ao meio. Nas Equações (3.2) e (3.3), η (h^{-1}) é o parâmetro que determina a velocidade com que essa adaptação ocorre.

$$\frac{dF_1}{dt} = \eta F_1 (1 - F_1) \quad (3.2)$$

$$\frac{dF_2}{dt} = \begin{cases} 0, & t < lag_2 \\ \eta F_2 (1 - F_2), & t \geq lag_2 \end{cases} \quad (3.3)$$

O uso desse enfoque teve por objetivo suavizar a resposta da Equação (3.8), que apresentava solução inicial maior do que o medido experimentalmente. Isso ocorria, porque no instante inicial da simulação, todos os 10^7 esporos por grama, ou 0,00762 gramas de biomassa por grama de substrato eram considerados ativos, gerando uma derivada diferente de zero para o instante inicial do processo, Equação (3.4), resultando em uma concentração de CO_2 na saída de ar da coluna, muito maior do que zero. O valor especificado para a biomassa inicial foi medido no Laboratório de Agroenergia através do método da glucosamina.

As fases de crescimento primária e secundária foram adotadas de modo que o modelo representasse o perfil apresentado por algumas curvas de CO_2 , que apresentaram um segundo pico de respiração com cerca de 30 horas do início do processo. Essas equações foram divididas em biomassa total (X_{T_1} e X_{T_2}) e biomassa viável (X_{v_1} e X_{v_2}), Equações (3.4) e (3.5) e Equações (3.6) e (3.7), respectivamente para cada fase de crescimento, dadas em gramas de biomassa por gramas de substrato, ou (g_X/g_S) (Mitchell *et al.*, 2006). Nas equações, μ (h^{-1}) é o crescimento específico do microrganismo, $X_{M_{1,2}}$ (g_X/g_S) o fator de máxima biomassa por massa de substrato para as respectivas fases de crescimento, k_d (h^{-1}) é a velocidade de morte celular, Y_{XCO_2} ($mmol_{CO_2}/g_X$) é o coeficiente de produção de CO_2 por biomassa devido ao crescimento celular e m_{XCO_2} ($mmol_{CO_2}/g_Xh$) é o coeficiente de produção de CO_2 por biomassa devido à manutenção celular. Todos os parâmetros deste equacionamento variaram de acordo com as condições de temperatura e a umidade inicial do substrato nas quais os experimentos foram conduzidos. Na Equação (3.8), tem-se que: $\frac{dX}{dt} = \frac{dX_{T_1}}{dt} + \frac{dX_{T_2}}{dt}$ e $X = X_{v_1} + X_{v_2}$.

$$\frac{dX_{v_1}}{dt} = F_1 \left(\mu X_{v_1} \left(1 - \frac{X_{T_1}}{X_{M_1}} \right) - k_d X_{v_1} \right) \quad (3.4)$$

$$\frac{dX_{T_1}}{dt} = F_1 \mu X_{v_1} \left(1 - \frac{X_{T_1}}{X_{M_1}} \right) \quad (3.5)$$

$$\frac{dX_{v_2}}{dt} = F_2 \left(\mu X_{v_2} \left(1 - \frac{X_{T_2}}{X_{M_2}} \right) - k_d X_{v_2} \right) \quad (3.6)$$

$$\frac{dX_{T_2}}{dt} = F_2 \mu X_{v_2} \left(1 - \frac{X_{T_2}}{X_{M_2}} \right) \quad (3.7)$$

$$r_{CO_2} = Y_{CO_2X} \frac{dX}{dt} + m_{XCO_2} X \quad (3.8)$$

A produção enzimática, associada ao crescimento, foi descrita segundo o modelo de Ludueking-Piret, conforme as Equações (3.9) e (3.10), respectivamente endoglucanase e xilanase. Nessas equações, Y_{XEnd} e Y_{XXyl} definem a velocidade de formação dos produtos associados ao crescimento celular, β_{XEnd} e β_{XXyl} a velocidade de formação dos produtos não associados ao crescimento celular e k_{DEnd} e k_{DXyl} a velocidade da degradação das enzimas (Shuler e Kargi, 2002).

$$\frac{dE_{nd}}{dt} = Y_{XEnd} \frac{dX}{dt} + \beta_{XEnd} X - k_{DEnd} E_{nd} \quad (3.9)$$

$$\frac{dX_{il}}{dt} = Y_{XXyl} \frac{dX}{dt} + \beta_{XXyl} X - k_{DXyl} X_{il} \quad (3.10)$$

De acordo com o 3º objetivo desse capítulo, após a realização do experimento 15, uma restrição foi adicionada ao modelo para que se obtivesse uma melhor representação do processo experimental em temperatura variável. No modelo desenvolvido por (Dalsenter *et al.*, 2005), o histórico de condições operacionais do processo determina a viabilidade celular dos microrganismos. O equacionamento proposto foi considerado durante o desenvolvimento desse capítulo. No entanto, os resultados não foram capazes de representar as curvas da respiração celular com acuidade, tanto nas condições de temperatura estática, quanto nas condições variáveis. Por esse motivo, para representar os efeitos deletérios do aumento da temperatura na viabilidade celular, a Equação (3.11) foi adicionada ao modelo. Essa equação não tem nenhum efeito em caso de temperaturas estáticas.

$$k_d(k) = \max(k_D(k = 0: t)) \quad (3.11)$$

Todos os parâmetros estão em função da temperatura e da umidade inicial do substrato. No caso das Equações (3.11), a cada novo instante de amostragem k um novo valor de k_d , em função da temperatura nesse instante, é registrado e o maior valor da série histórica para k_d é assumido como valor atual para esse parâmetro. Os valores de Y_{XCO_2} e de m_{XCO_2} foram estimados, segundo o observado por (Sargantanis *et al.*, 1993), respectivamente por

21,5 $mmol_{CO_2}/g_x$ e 1,1 $mmol_{CO_2}/g_x h$. Esses valores foram os que resultaram nos melhores ajustes dos demais parâmetros para todas as condições ambientais estudadas.

3.3.2. Ajuste e Interpolação dos Parâmetros

O ajuste dos parâmetros dos modelos foi realizado através da ferramenta de identificação do tipo “caixa cinza” para equações diferenciais não lineares do software *Matlab*[®] utilizando a metodologia de busca pelos Mínimos Quadrados (Coleman e Li, 1996). Por identificação do tipo “caixa cinza” deve-se entender que o modelo das equações diferenciais ordinárias é conhecido e que a metodologia de busca retornará os parâmetros que melhor ajustam o modelo aos dados experimentais. A função utilizada foi a *idnlgrey* do *toolbox* de identificação, sendo que a estimação dos parâmetros foi realizada através do método de Levenberg-Marquadt¹. O objetivo desta função é ajustar os parâmetros das equações de estado processo, Equações (3.2) a (3.7), juntamente com os parâmetros das variáveis de saída, respostas das Equações (3.8) a (3.10), às medidas experimentais: a formação de CO₂, endoglucanase e xilanase. Na rotina de busca são definidos os valores iniciais dos parâmetros, assim como os valores mínimo e máximo de busca, são definidas as condições iniciais dos estados do processo e quais são os parâmetros que podem variar.

Para que modelo pudesse prever as condições operacionais não avaliadas, interiores à região estudada e exteriores próximas à essa, foi necessário calcular uma superfície de resposta para cada um dos parâmetros propostos. Assim, foi criada uma superfície de resposta, para cada um dos parâmetros, em uma região de temperatura e umidade inicial do meio na qual o modelo tivesse que representar adequadamente os resultados experimentais. Foram testados dois métodos para se calcular as superfícies, uma interpolação cúbica e uma polinomial. Ambos os métodos foram calculados através da função *fit* do *Matlab*[®]. Essa função utiliza o método dos mínimos quadrados para ajustar uma função polinomial de grau predeterminado aos dados obtidos. Primeiramente, foi testada a interpolação cúbica, na qual o ajuste da curva é priorizado para os pontos experimentais. O modelo obtido foi utilizado no algoritmo de otimização e o perfil de temperaturas gerado foi testado experimentalmente, na condição de umidade inicial do substrato de 60%. Após desse experimento, observou-se que o ajuste polinomial representava com maior fidelidade as curvas experimentais do processo quando comparadas

¹ <http://www.mathworks.com/help/ident/ref/nlgreyestoptions.html>, acessado em 16/05/2016.

com a interpolação cúbica. Além disso, o ajuste polinomial apontou que a produtividade de enzimas era mais na umidade de 66%. Novos teste e experimentos foram realizados conforme o procedimento descrito a seguir.

Roteiro utilizado para o ajuste dos parâmetros

1° Passo: Após coleta dos dados experimentais dos ensaios de 1 a 11 da Tabela 3.1, foram ajustados os parâmetros para crescimento microbiano descrito pela média das curvas de CO₂, através da função *idnlgrey*.

2° Passo: Utilizando a resposta do modelo de crescimento obtido no 1° passo, as respostas experimentais da produção enzimática foram ajustadas às Equações (3.9) e (3.10) para cada condição experimental.

3° Passo: Foi calculada a interpolação cúbica para cada um dos parâmetros das Equações (3.2) a (3.10). Obtida a interpolação do modelo, este foi aplicado no algoritmo de otimização desenvolvido para cálculo das melhores condições ambientais do processo. Foram realizados os experimentos 12 e 13 a fim de se aprimorar o conhecimento da dinâmica microbiana nas condições “ótimas” de umidade proposta pelo algoritmo de otimização para a primeira versão do modelo, ou seja, 60% de umidade inicial do processo.

4° Passo: Foram observadas discrepâncias entre os valores medidos de CO₂ e produção enzimática e os valores previstos pelo modelo quando aplicado experimentalmente o primeiro perfil de temperaturas proposto pelo algoritmo utilizado. Essas diferenças foram minimizadas com o uso da interpolação polinomial quadrática, na qual foram considerados também os experimentos 12 e 13. Essa nova versão do modelo indicou que as melhores condições de umidade inicial do substrato se encontravam a 66%. Com essa atualização, foi realizada nova rodada de otimização, que resultou no perfil proposto para o experimento 15.

5° Passo: Mais uma vez foram observadas divergências entre o resultado previsto pelo modelo e o observado experimentalmente para as condições do experimento 15. Constatou-se que era necessário a realização de experimentos em temperaturas abaixo de 37°C na umidade do substrato proposta. Assim foram realizados os experimentos 17 e 18, seguidos dos respectivos ajustes de parâmetros. Observou-se também que o modelo representava melhor os resultados do experimento 15 através de uma interpolação ponderada, cujo objetivo foi priorizar os o ajuste dos parâmetros para umidades superiores a 60%, condições experimentais que apresentaram maior produção de celulasas. Os pesos para os experimentos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9-11, 12, 13, 17 e 18, da Tabela 3.1, foram respectivamente: [1; 1; 4; 16; 1; 12; 1; 0; 2; 8; 4; 12; 12]. Notou-

se também que o resultado da simulação foi melhorado quando o parâmetro β_{XEnd} foi interpolado por um polinômio de ordem 2x3, umidade x temperatura. Para que os efeitos deletérios da temperatura fossem considerados, foi inserida a Equação (3.11) ao modelo e nova rodada de otimização foi realizada, experimento 19. Para os experimentos de 9 a 11 foi considerada a média dos parâmetros.

6° Passo: Foram ajustados os parâmetros de crescimento para cada uma das curvas de CO₂ obtidas nos ensaios de 9 e 11 e foram calculados seus respectivos desvios. Esses desvios foram normalizados e extrapolados para as demais condições experimentais.

Após o 5° passo, o modelo final com interpolação polinomial de 2° grau ponderada foi capaz de descrever com acuidade os efeitos das variações da temperatura tanto no perfil de CO₂, quanto na produção de enzimas. Os resultados dos experimentos 19 e 20 ficaram dentro do intervalo de confiança determinado pelos desvios padrões calculados no passo 6.

O experimento 20 foi realizado a fim de se validar o modelo matemático desenvolvido, tanto para averiguação do crescimento microbiano, quanto para a produção de enzimas.

3.4. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO

3.4.1. Condição Ótima via Modelagem Matemática

Através da modelagem matemática do processo, descrita pelas Equações de (3.2) a (3.11), foi possível realizar uma busca minuciosa pela melhor condição operacional através da resposta do modelo. O modelo foi simulado para as temperaturas entre 27°C e 40°C, de 1°C em 1°C, com umidade inicial do substrato de 66%. Antes da última atualização do modelo, a temperatura ótima para o processo era de 34°C a 66% de umidade inicial, cuja produção média esperada para endoglucanase era de 133,6 U/g_{Ms}. Essa condição de 34°C a 66% de umidade foi a utilizada para validação dos dados experimentais a temperatura constante. Após um último ajuste do modelo, o melhor resultado encontrado foi de 32°C e 66% de umidade, com produção média esperada de endoglucanase é de 139,7 U/g_{Ms}.

3.4.2. Algoritmo Iterativo

A metodologia de otimização utilizada nesse trabalho é uma operação evolucionária para a solução de um problema de programação não linear inteira mista. Nesse tipo de abordagem computacional os estados do processo somente podem assumir valores inteiros e são válidos dentro de uma região definida. O modelo do processo é não linear e o perfil de temperatura que otimiza o processo é calculado iterativamente. A cada iteração do algoritmo a temperatura pode variar -1°C , 0°C e $+1^{\circ}\text{C}$ a partir de seu estado atual. Desse modo, uma sequência de trajetórias é gerada pela combinação das variações da temperatura para os próximos N instantes de amostragem. O processo é simulado para cada uma das trajetórias propostas. O caminho que resulta no maior valor para a produção das enzimas é registrado e a primeira ação tomada por esse é registrada como valor da temperatura da próxima iteração de otimização. Assim, sequencialmente, o perfil da temperatura que resulta na maior produção das enzimas é gerado.

Para as duas primeiras otimizações realizadas, o procedimento foi conduzido em duas etapas. A primeira foi determinar qual a condição inicial que resultava no maior valor de produção das enzimas utilizando $N=6$. A segunda foi realizar nova rodada de otimização da melhor condição inicial da primeira etapa, dessa vez com $N=9$, expandindo o horizonte de previsão e conseqüentemente a performance do processo. O horizonte de buscas reduzido da primeira etapa teve por objetivo diminuir o tempo computacional total de cada rodada de otimização, porque o número de cálculos aumenta exponencialmente a cada incremento no horizonte de previsão. Na terceira otimização, o horizonte de busca foi de $N=12$, resultando em um conjunto de mais de 540000 diferentes caminhos a cada nova rodada.

A função objetivo que determina o máximo da produção das enzimas foi definida como o máximo de produção de endoglucanase para $t = n + N$ sujeita aos perfis de temperatura p , conforme mostrado na Equação (3.12), onde n é o instante de tempo atual da busca.

$$f = \max_p \left(E_{nd}(T_p, U, t = n + N) \right) \quad (3.12)$$

sujeito a

$$27^{\circ}\text{C} < T < 47^{\circ}\text{C}$$

$$34\% < U < 68\%$$

$$p = \binom{N}{3}$$

onde $E_{nd}(T, U, t = n + N)$ é dado pela evolução da Equação (3.9) e p são todos os possíveis caminhos resultantes das combinações das variações da temperatura. O algoritmo 1 descreve os passos desse procedimento.

Algoritmo 1

1° Passo: Carrega os parâmetros do processo, inicializa as variáveis de estado, ($T = T_0$), ($U = U_0$) e ($n = 0$) e gera sequências para o horizonte de previsão definido (N).

2° Passo: Simula as Equações de (3.2) a (3.11) de modo que: para $p = p_1$ até $p = p_f$, ($T_u = T(0:n)$); Para $t = 0$ até $t = n + N$, se $t < n \Rightarrow T_S(n) = Tu(t)$, senão $T_S = T_S(n) + p(n - t)$. Calcula-se $\max_{p_{1:f}}(E_{nd}(T_S, U, t = n + N))$ e retorna $p(i, 1)$.

3° Passo: $n = n + 1$; $T(n + 1) = T(n) + p(i, 1)$; Caso $n < 42$, volte ao passo 2, senão vá para o passo 4.

4° Passo: Retorna T , $E_{nd}(t = 42)$; fim

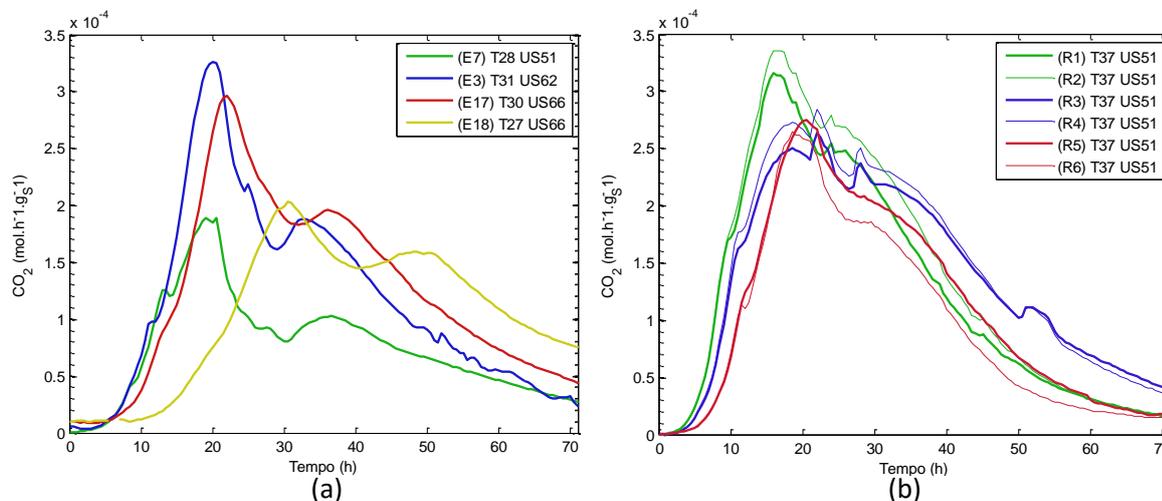
A cada novo aprimoramento do modelo, esse algoritmo foi executado novamente, gerando sempre um novo perfil de temperatura. O perfil gerado na terceira rodada, apresentava ganhos de 6% na média da produção enzimática, mas o modelo ainda precisou ser reajustado para melhor se enquadrar em todas as condições cujas temperaturas não fossem superior a 40°C, faixa de maior produção enzimática. Ao final desse último ajuste nenhum dos perfis gerados apresentou média de produção superior àquela estimada para a temperatura de 32°C, foram testados também diferentes momentos para se iniciar as variações da temperatura. Esse teste resultou em pequenas melhoras na produtividade toda vez que o instante inicial das variações foi maior do que 25 horas, mas cujos resultados não ultrapassavam 0,2% de incremento e, portanto, não justificando uma análise experimental.

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Figura 3.1 (a) mostra os picos de CO₂ que ocorreram tardiamente, resultados dos experimentos 3, 7, 17 e 18 da Tabela 3.1, deixando claro que existe uma segunda fase de crescimento exponencial. Esse fenômeno também ocorre em todas as repetições da Figura 3.1 (b), no entanto em menor escala. Essa segunda fase de crescimento provavelmente está

relacionada com a necessidade de exploração de novas fontes de nutrientes disponíveis no substrato, uma vez que primeiro são consumidas as mais facilmente assimiláveis (Carlile *et al.*, 2001). Isso pode ocorrer, porque com a secreção das enzimas, novos nutrientes passam a estar disponíveis.

Figura 3.1: Evolução e variabilidade do crescimento microbiano.



A Figura 3.1 foi elaborada pelo autor da tese.

A Figura 3.1 (b) mostra a variação do comportamento do microrganismo observado nos experimentos 9, 10 e 11, todos realizados nas mesmas condições ambientais. Parte das variações é devida a um erro de $\pm 10\%$ entre as saídas do distribuidor de fluxo de ar para as colunas. Esse erro pode causar as diferenças observadas na amplitude da evolução da respiração celular dentro de uma mesma rodada de experimentos. No entanto, somente variações no fluxo de ar não causariam as diferenças observadas no tempo de adaptação do microrganismo ao meio fermentativo, tampouco às velocidades de crescimento exponencial e morte celular. Conclui-se por isso que o microrganismo se adapta, cresce e morre de maneira diferente a cada nova batelada, gerando um determinado intervalo de confiança para os parâmetros de crescimento microbiano, que, por conseguinte, gerarão diferenças na formação de produtos. As oscilações menores, com características de ruído, observadas ao longo da curva são provenientes de oscilações do controle do fluxo de ar.

Os dados de formação de xilanase e de a endoglucanase são apresentadas na Tabela 3.2, onde \bar{x} é a média de cada triplicata e σ^2 é o desvio padrão calculado. Nota-se com os resultados do ponto central que pode haver grande variabilidade na formação de produto em uma mesma condição ambiental. A quarta repetição do ponto central pode ser considerada um resultado atípico na formação de xilanase. No entanto, para o mesmo experimento, a formação de endoglucanase foi comprometida somente na amostra de 48h. O contrário ocorreu na primeira

repetição, na qual os resultados de endoglucanase foram abaixo do normal, enquanto os de xilanase se mantiveram normais. Os resultados do ponto central considerados normais são aqueles que não apresentam grandezas semelhantes aos produzidos nos ensaios adjacentes. Portanto, um resultado de 75 UI/g para xilanase e 45 UI/g para endoglucanase são atípicos.

Outra consideração importante a respeito dos resultados de formação de produtos é o número de ocorrências em que os valores medidos foram muito abaixo do esperado e, em média, o quanto foram. Dentre os resultados do ponto central, são contados 6 em 24 análises, ou 25% dos eventos, com valores 50% menores no caso da xilanase e 45% menores no caso da endoglucanase. Tal análise não é válida para o caso do experimento 8, pois não foi registrado qualquer crescimento microbiano durante as medidas de CO₂.

Tabela 3.2: Cinética da formação de Xilanase e Endoglucanase.

Ensaio			Xilanase (UI/g _{MS})						Endoglucanase (UI/g _{MS})					
T		US	24h		48h		72h		24h		48h		72h	
[°C]		[%]	\bar{x}	σ^2	\bar{x}	σ^2	\bar{x}	σ^2	\bar{x}	σ^2	\bar{x}	σ^2	\bar{x}	σ^2
R1	37	51	142,7	2,3	154,5	4,9	139,5	3,7	34,0	4,6	47,4	1,3	45,3	2,5
R2	37	51	146,6	4,5	168,1	5,7	115,0	10,6	44,5	4,0	75,7	1,1	72,8	4,8
R3	37	51	157,2	3,4	135,6	5,2	152,4	11,5	40,6	1,8	71,0	0,5	67,7	1,9
R4	37	51	70,2	6,8	75,2	3,9	60,2	1,1	39,1	1,3	45,1	1,1	72,8	8,3
7	28	51	101,9	3,0	154,5	10,9	142,8	4,0	18,2	1,0	75,9	4,0	67,7	4,4
5	37	36	131,7	18,4	121,4	11,4	94,3	9,1	46,3	1,5	51,0	0,5	50,8	3,7
8	46	51	4,6	0,3	4,4	0,5	3,7	0,7	4,0	0,4	4,8	1,6	3,3	1,6
6	37	66	171,1	5,5	171,3	5,4	115,6	4,2	39,8	2,1	63,8	1,5	78,9	1,0
2	43	40	87,3	5,1	173,5	9,0	108,5	6,0	15,0	2,4	38,9	1,9	35,9	2,5
1	31	40	157,5	6,7	157,4	6,0	140,4	16,1	26,4	2,9	43,4	4,9	36,8	0,4
3	31	61	121,2	9,1	180,0	0,7	N/A		19,9	4,6	63,7	2,3	N/A	
4	43	61	119,3	13,5	199,2	5,4	201,9	4,8	28,6	3,4	65,3	1,0	74,6	6,2
12	40	60	172,0	11,3	204,5	3,3	155,1	2,0	64,7	7,6	76,6	23,3	74,8	1,5
13	34	60	147,6	2,8	164,6	6,8	127,4	4,6	50,1	5,4	74,3	6,5	70,3	2,2
17	30	66	122,6	5,5	273,8	21,8	252,3	3,2	36,7	2,7	160,2	21,1	149,6	17,7
18	27	66	87,1	9,2	229,3	8,5	248,3	3,6	37,8	5,4	101,3	14,1	156,6	16,4

3.5.1. Ajuste do Modelo

O resultado do ajuste dos parâmetros do modelo de crescimento microbiano é apresentado na Tabela 3.3. No caso do experimento 8 não foi observado nenhum crescimento

celular, devido à alta temperatura do processo, o que resultou em um ajuste cujos parâmetros não tinham significado. Portanto, esses dados foram excluídos para não prejudicar a interpolação das demais condições experimentais. Para os experimentos de 9 a 11 foi considerado o valor da média dos parâmetros obtidos. Observa-se que os parâmetros variam entre todos os experimentos, pois as condições operacionais de temperatura e umidade inicial do substrato variam entre os ensaios.

Tabela 3.3: Parâmetros do modelo de crescimento microbiano para cada condição experimental.

Ensaio	μ_F		lag_2		μ		k_d		X_{M_1}		X_{M_2}		R^2
	\bar{x}	σ^2											
1	1,001	0,019	24,35	2,35	0,193	0,022	0,023	0,005	0,108	0,007	0,023	0,002	0,90
2	0,840	0,016	16,00	1,54	0,187	0,021	0,028	0,006	0,117	0,008	0,010	0,001	0,91
3	0,981	0,018	20,44	1,97	0,330	0,038	0,039	0,009	0,147	0,010	0,042	0,004	0,86
4	0,940	0,017	18,05	1,74	0,240	0,027	0,024	0,006	0,204	0,013	0,028	0,003	0,91
5	1,142	0,021	18,02	1,74	0,346	0,039	0,060	0,014	0,121	0,008	0,044	0,004	0,92
6	1,151	0,021	20,08	1,94	0,335	0,038	0,062	0,014	0,197	0,013	0,053	0,005	0,91
7	1,300	0,024	24,58	2,37	0,269	0,031	0,027	0,006	0,091	0,006	0,023	0,002	0,80
9-11	1,770	0,033	19,68	1,90	0,295	0,034	0,048	0,011	0,177	0,012	0,061	0,006	0,91
12	1,415	0,027	22,50	2,44	0,286	0,029	0,025	0,006	0,142	0,009	0,030	0,003	0,88
13	1,303	0,025	17,72	1,75	0,337	0,037	0,061	0,013	0,222	0,015	0,062	0,006	0,94
16	1,161	0,022	16,69	0,84	0,332	0,039	0,043	0,007	0,194	0,011	0,020	0,002	0,95
17	0,846	0,016	21,33	2,06	0,299	0,034	0,036	0,008	0,146	0,010	0,045	0,004	0,90
18	0,606	0,013	27,86	2,53	0,206	0,025	0,035	0,007	0,127	0,008	0,035	0,004	0,90

Os valores para o crescimento máximo específico, μ , nesse trabalho variaram entre $0,18h^{-1}$ e $0,35h^{-1}$. Para a constante de morte celular, k_d , a variações foi entre $0,023 h^{-1}$ e $0,063h^{-1}$. Para os valores de concentração máxima de biomassa é necessário somar X_{M_1} com X_{M_2} pois sua soma representa o máximo estimado durante os experimentos. Desse modo, essa concentração teve variação entre $0,11 g_X/g_{MS}$ e $0,28 g_X/g_{MS}$. Na literatura, para o crescimento de cepas do *Aspergillus niger* foram encontrados valores variando entre $0,17 h^{-1}$ e $0,27 h^{-1}$ (Hamidi-Esfahani *et al.*, 2004; Hamidi-Esfahani *et al.*, 2007). Para o fungo *Gibberella fujikuroi* variaram entre $0,12 h^{-1}$ e $0,57 h^{-1}$ (Gelmi *et al.*, 2002) e para o *Rhizopus oligosporus* de $0,324 h^{-1}$ (Saucedo-Castaneda *et al.*, 1990). A constante de morte celular é a menos discutida na parte de modelagem. Ainda assim, para *Gibberella fujikuroi* variaram entre $0,02 h^{-1}$ e $0,044 h^{-1}$. Por fim, os valores de concentração máxima de biomassa encontrados foram, para o *Aspergillus niger*, entre $0,15 g_X/g_{MS}$ e $0,34 g_X/g_{MS}$ e para o *Rhizopus*

oligosporus foi de $0,125 g_X/g_{MS}$. Os valores de μ_F e lag_2 não possuem referências na literatura por se tratarem de um estrutura utilizada, até então, somente neste trabalho.

A interpolação ponderada do 5º passo para cada um dos parâmetros retornou as Equações de (3.13) a (3.18) e a precisão do ajuste dos parâmetros foram $R_{\mu}^2 = 86\%$; $R_{k_d}^2 = 68\%$; $R_{X_{M_1}}^2 = 51\%$; $R_{X_{M_2}}^2 = 73\%$; $R_F^2 = 89\%$; $R_{lag_2}^2 = 62\%$. Salienta-se que o objetivo dessa abordagem não foi obter bons ajustes individuais para os parâmetros, mas sim uma representatividade adequada do crescimento microbiano nas condições de maior umidade inicial do substrato. As superfícies encontradas são mostradas no material suplementar disponível no Apêndice A desse capítulo.

$$\mu(U, T) = -1,543 - 9,85 \cdot 10^{-3}U + 0,118T + 5,8 \cdot 10^{-5}U^2 - 1,80 \cdot 10^{-3}T^2 + 1,61 \cdot 10^{-4}UT \quad (3.13)$$

$$k_d(U, T) = -0,531 - 3,29 \cdot 10^{-3}U + 0,038T + 4,2 \cdot 10^{-5}U^2 - 5,2 \cdot 10^{-4}T^2 - 2,4 \cdot 10^{-4}UT \quad (3.14)$$

$$\mu_F(U, T) = -13,2 + 0,237U + 0,485T - 2,17 \cdot 10^{-3}U^2 - 6,48 \cdot 10^{-3}T^2 - 2,1 \cdot 10^{-4}UT \quad (3.15)$$

$$lag_2(U, T) = -33,56 + 2,9U - 0,633T - 19,1 \cdot 10^{-3}U^2 + 22,4T^2 - 27,0 \cdot 10^{-3}UT \quad (3.16)$$

$$X_{M_1}(U, T) = -0,612 + 5,7 \cdot 10^{-3}U + 30,7 \cdot 10^{-3}T - 8,0 \cdot 10^{-5}U^2 - 5,1 \cdot 10^{-4}T^2 + 1,4 \cdot 10^{-4}UT \quad (3.17)$$

$$X_{M_2}(U, T) = -0,97 + 11,9 \cdot 10^{-3}U + 38,6 \cdot 10^{-3}T - 4,8 \cdot 10^{-5}U^2 - 3,9 \cdot 10^{-4}T^2 - 1,9 \cdot 10^{-4}UT \quad (3.18)$$

O resultado do ajuste dos parâmetros para a formação de produtos é mostrado na Tabela 3.4, onde também seguem os erros dos ajustes para ambas enzimas estudadas.

Tabela 3.4: Parâmetros do modelo de formação de produtos para cada condição experimental.

T [°C]	U [%]	Y_{XEnd}	m_{XEnd}	k_{DEnd}	Y_{XXyl}	m_{XXyl}	$k_{D_{Xyl}}$	R_{End}^2	R_{Xyl}^2
37	51	32	39	0,036	1128,3	0,00	0,013	0,96	0,99
37	36	555,9	0,03	0,010	1833,7	0,15	0,025	0,96	0,99
37	66	197,6	7,04	0,000	1287,8	0,08	0,020	0,90	0,99
28	51	0,0	50,00	0,055	1374,4	12,45	0,015	0,87	0,98
31	40	5,5	45,00	0,053	1874,8	0,25	0,014	0,94	0,99
43	40	318,6	5,75	0,020	2274,3	22,11	0,041	0,99	1
31	62	0,0	29,35	0,020	1118,7	0,03	0,003	0,94	0,98
43	62	281,3	2,97	0,000	1243,9	0,08	0,005	0,94	0,99
40	60	456,9	0,00	0,007	1357,1	0,01	0,014	0,90	0,99

34	60	251,1	15,14	0,007	1114,3	0,01	0,014	0,95	0,95
30	66	0,0	82,2	0,028	713,1	129,4	0,037	0,92	0,99
27	66	0,0	75,7	0,029	1145,4	180,0	0,061	0,88	0,89

Seguindo o 5º passo da metodologia da modelagem matemática, foi testada a ponderação usada na interpolação do crescimento microbiano. Novamente, o objetivo desse teste não foi conseguir os melhores valores para o ajuste individual dos parâmetros, mas sim um melhor ajuste para as curvas de formação de produto. O melhor resultado foi obtido através de uma interpolação não ponderada. Também foram testadas diferentes graus para as superfícies de interpolação que, exceto pelo ajuste de $m_{X_{End}}$ que apresentou um melhor resultado através de uma superfície 2x3 (UxT), obtiveram melhores resultados por meio de uma superfícies quadrática (dados não mostrados). Para cada um dos parâmetros das Equações de (19) a (24) a precisão do ajuste foi: $R_{Y_{X_{End}}}^2 = 70\%$; $R_{m_{X_{End}}}^2 = 88\%$; $R_{k_{D_{End}}}^2 = 75\%$; $R_{Y_{XXyl}}^2 = 83\%$; $R_{m_{XXyl}}^2 = 82\%$; $R_{k_{D_{Xyl}}}^2 = 82\%$. As superfícies encontradas são mostradas no material suplementar disposto no Apêndice A desse capítulo.

$$Y_{X_{End}}(U, T) = 1721 - 102,1U + 38,05T - 0,83U^2 - 0,45T^2 - 0,37UT \quad (3.19)$$

$$m_{X_{End}}(U, T) = 6589 - 235,0U - 190,4T + 1,87U^2 - 0,72T^2 + 7,67UT - 0,028UT^2 - 0,053U^2T + 0,024T^3 \quad (3.20)$$

$$k_{D_{End}}(U, T) = 0,655 - 1,77 \cdot 10^{-3}U - 0,026T - 4,75 \cdot 10^{-5}U^2 - 2,1 \cdot 10^{-4}T^2 - 1,5 \cdot 10^{-4}UT \quad (3.21)$$

$$Y_{XXyl}(U, T) = 10430 - 126,0U - 308,1T + 0,819U^2 + 4,46T^2 + 0,261UT \quad (3.22)$$

$$m_{XXyl}(U, T) = 820,4 - 6,10U - 38,59T + 0,22U^2 + 0,805T^2 - 0,412UT \quad (3.23)$$

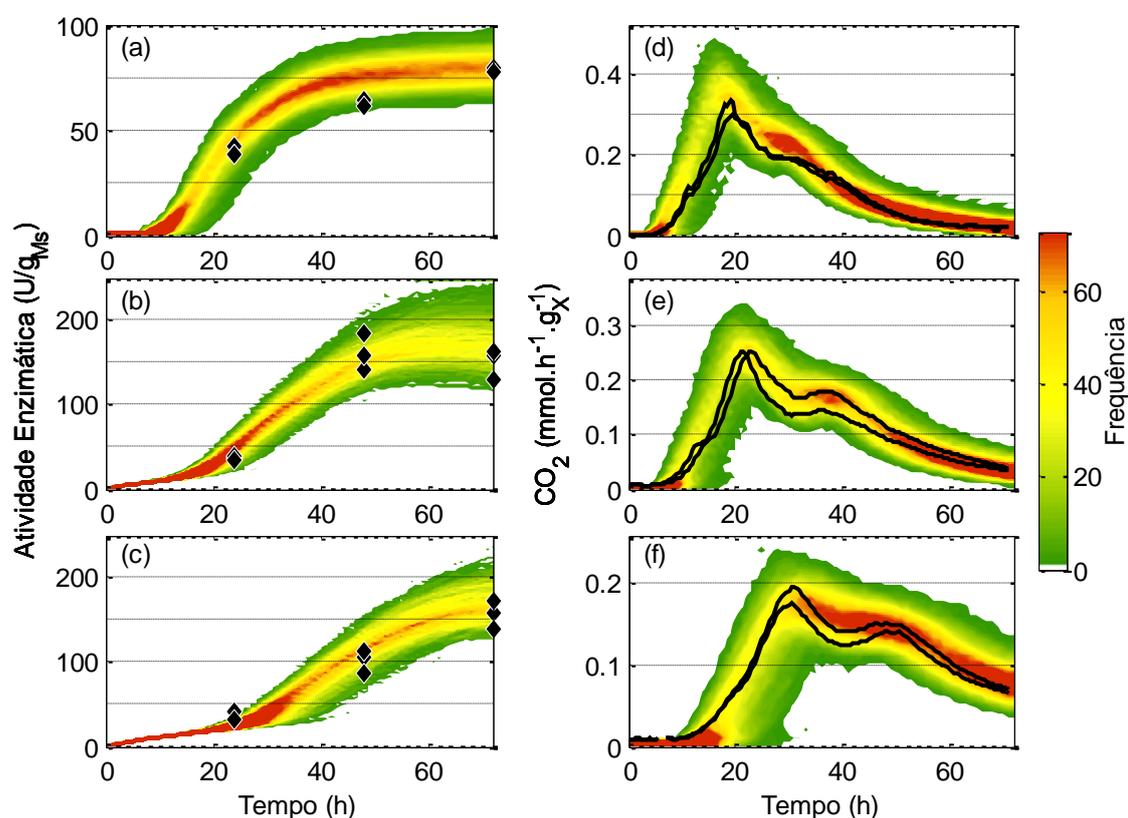
$$k_{D_{XXyl}}(U, T) = 0,127 - 9,98 \cdot 10^{-4}U - 5,23 \cdot 10^{-3}T + 6,91 \cdot 10^{-5}U^2 + 2,03 \cdot 10^{-4}T^2 - 1,76 \cdot 10^{-4}UT \quad (3.24)$$

3.5.1.1. Evolução do Crescimento Microbiano e da Produção Enzimática

A Figura 3.2 mostra as curvas de endoglucanase e da respiração microbiana, sobrepostas às previsões feitas pela modelagem matemática, para as temperaturas de 37°C, 30°C e 27°C. As Figuras 3.2 (a) e (d) são respectivamente as curvas de endoglucanase e CO₂, o mesmo ocorrendo em (b) e (e), e (c) e (f), para as temperaturas na sequência mencionada. Para se obter

uma boa distribuição dos possíveis caminhos que o processo pode tomar, segundo o intervalo de confiança dos parâmetros do modelo, foram realizadas 1000 simulações para cada condição experimental. Para cada vez que o processo foi simulado, os parâmetros foram gerados aleatoriamente segundo a distribuição normal, com os desvios padrões mostrados na Tabela 3.3. Na Figura 3.2, a barra lateral de frequências representa o número de vezes em que uma determinada medida foi encontrada, sendo que a maior frequência de eventos é 1000, somente quando $t = 0$. Salienta-se que o perfil de cores mostrado indica a frequência com que um determinado evento ocorreu, mas não indica o caminho assumido pelo mesmo, somente a possibilidade da existência de tal resultado.

Figura 3.2: Evolução da produção de endoglucanase e do crescimento microbiano. Em (a) e (d) $T_m=37^\circ\text{C}$, em (b) e (f) $T_m=30^\circ\text{C}$ e em (c) e (g) $T_m=27^\circ\text{C}$. Em (a), (b) e (c) os losangos pretos mostram os dados experimentais. Em (d), (e) e (f) as linhas pretas mostram os dados experimentais de CO_2 .



A Figura 3.2 foi elaborada pelo autor da tese.

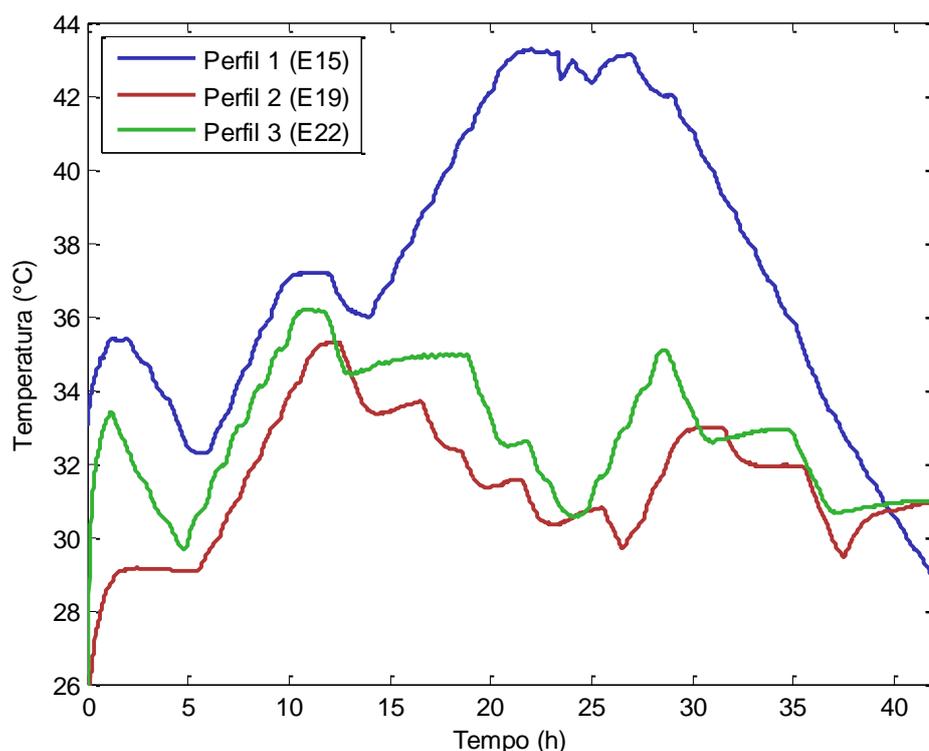
Nota-se que os resultados experimentais estão dentro dos intervalos de confiança estabelecidos pelo modelo e que na maior parte das vezes se encontram dentro da região de maior probabilidade de ocorrência. Isso demonstra que o modelo é capaz de representar com acuidade tanto o crescimento microbiano, quanto a produção enzimática em diversas condições operacionais. Observa-se que, apesar da interpolação dos parâmetros ter resultado em uma

baixa precisão para ajustes individuais sempre abaixo de 90%, em termos globais, o resultado experimental sempre está dentro da região esperada pelo modelo.

3.5.2. Otimização e Aprimoramentos do Modelo

A Figura 3.3 mostra a resposta do sistema de controle da temperatura do biorreator de colunas aos perfis de temperaturas calculados durante o trabalho. O Perfil 1 é o resultado experimental da temperatura do ensaio 15, o Perfil 2 é a temperatura do ensaio 19 e o Perfil 3 é o resultado do ensaio 22. A Figura 3.4 mostra tanto os efeitos da variação da temperatura dos dois últimos perfis de otimização avaliados, quanto os resultados dos testes para as temperaturas de 40°C e de 34°C, na evolução da produção enzimática e na evolução da curva de CO₂. Essas duas últimas foram realizadas a fim de se comparar a produtividade em condições estáticas de temperatura com os perfis para o tempo de processo de 42 horas.

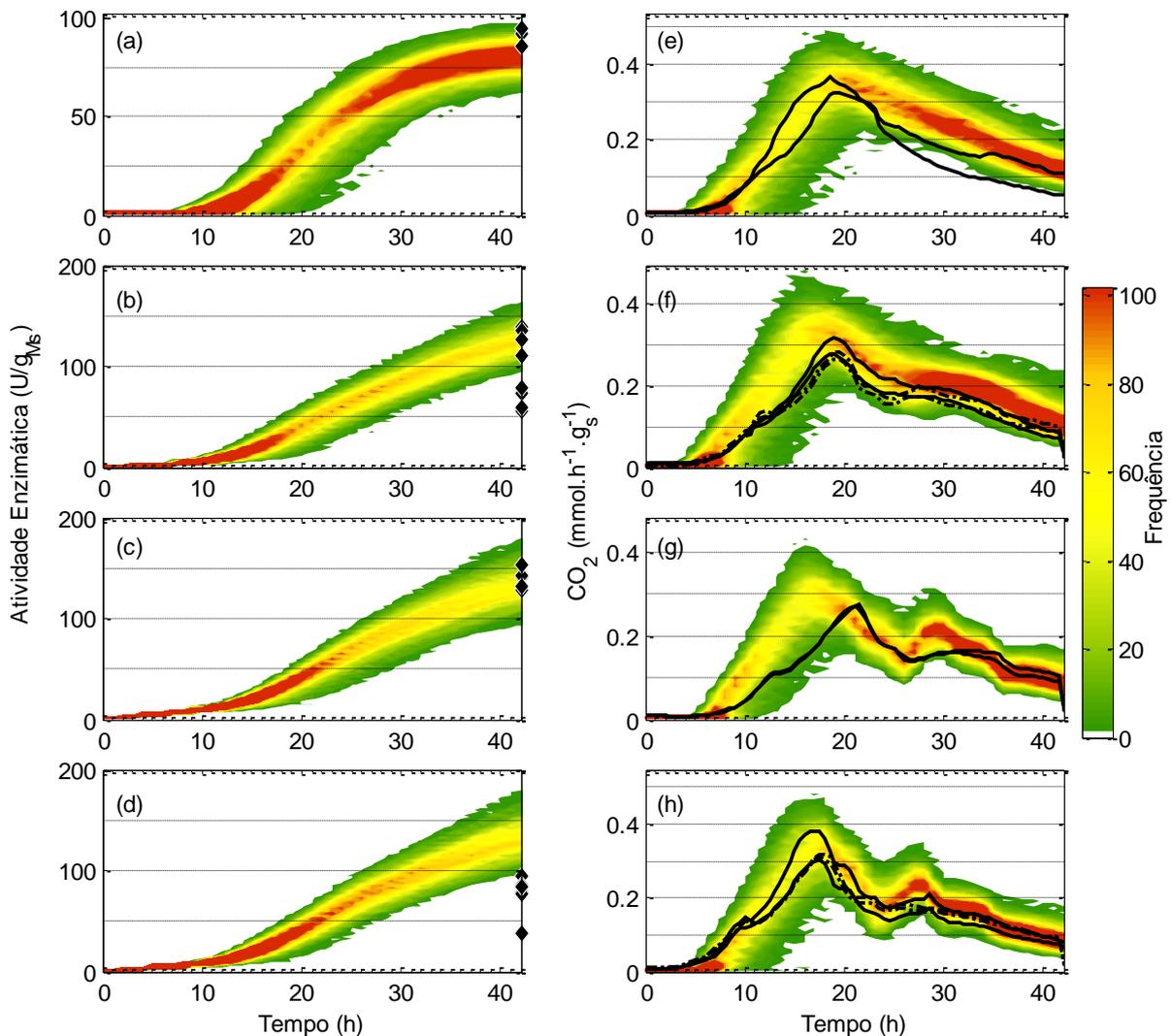
Figura 3.3: Resultado experimental dos perfis de temperatura calculados pelo algoritmo de otimização implementados no biorreator de colunas. O Perfil 1 foi calculado para o modelo sem ponderações e sem restrições (E15), Perfil 2 foi calculado com a segunda versão do modelo aprimorado, para horizonte de busca N=7 (E19) e Perfil 3 foi calculado com a terceira versão do modelo aprimorado, com horizonte de busca N=12 (E22).



A Figura 3.3 foi elaborada pelo autor da tese.

Nas Figuras 3.4 foram sobrepostos os resultados experimentais e resultados das simulações para os experimentos terminados com 42 horas. As figuras foram elaboradas sob as mesmas considerações feitas para as 1000 repetições da Figura 3.2. As Figuras 3.4 (a) e (e) são respectivamente as curvas de endoglucanase e CO_2 , o mesmo se repetindo para (b) e (f), (c) e (g), e (d) e (h), para as temperaturas e perfis de temperaturas nela descritos. Todos os experimentos foram realizados com umidade inicial do substrato de 66%. Na Figura 3.4 de (a) a (d), os losangos pretos são os resultados experimentais nas condições especificadas. Na Figura 3.4 (f) e (h) as linhas pontilhadas mostram os resultados da repetição dos experimentos nas referidas condições.

Figura 3.4: Evolução da produção de endoglucanase e do crescimento microbiano para experimentos com período de 42 horas. Em (a) e (e) $T_m=40^\circ\text{C}$, em (b) e (f) $T_m=34^\circ\text{C}$, em (c) e (g) $T_m=\text{Perfil 2}$ e, em (d) e (h) $T_m=\text{Perfil 3}$. Em (a), (b), (c) e (d) os losangos pretos mostram os dados experimentais. Em (e), (f), (g) e (h) as linhas pretas mostram os dados experimentais de CO_2 .



A Figura 3.4 foi elaborada pelo autor da tese.

Observa-se nas Figura 3. 4 (g) e (h) que o modelo desenvolvido foi capaz de estimar os efeitos das variações da temperatura do processo com acuidade. Isso porque, em ambas, as medidas experimentais de CO₂ não só estão dentro do intervalo de confiança previsto pelo modelo, como também acompanham as movimentações da respiração causadas pelas variações da temperatura. No caso da Figura 3. 4 (h), no qual o ensaio foi realizado em duplicata, em ambas as repetições os resultados experimentais estão de acordo com o previsto pelo modelo. Nota-se na Figura 3.4 (e) que o modelo não reproduziu os resultados experimentais durante um certo tempo. Esse resultado implica que o modelo pode não representar o processo com a mesma acuidade observada na Figura 3.2 em temperaturas maiores. Uma possível solução para tal situação seria a realização de um experimento para avaliar a cinética de crescimento microbiano e formação de produtos a 43°C, o que melhoraria as previsões feitas pelo modelo em altas temperaturas para esse processo. Por outro lado, uma vez que as melhores condições operacionais estão em torno de 32°C, não foi considerada necessária a realização desse experimento. Essa consideração é endossada pelo resultado apresentado na Figura 3.4 (f), na qual ambas repetições apresentaram evolução da respiração microbiana conforme o previsto pelo modelo.

Apesar da acuidade mediana na previsão do modelo para o crescimento microbiano na Figura 3.4 (e), o resultado da atividade enzimática esteve dentro do previsto, em torno dos 90 U/g_{M_s} de endoglucanase. Já no caso dos resultados apresentados em (b), salienta-se que os resultados do primeiro ensaio aconteceram conforme o previsto, mas na repetição os resultados foram bem inferiores, com média em torno de 70 U/g_{M_s}. O mesmo ocorreu com os resultados mostrados em (d), onde em ambas as repetições, apesar do crescimento microbiano ter ocorrido conforme o previsto, a formação dos produtos não apresentou o mesmo desempenho, com média de 86 U/g_{M_s}, sendo que o esperado para aquela condição seria de 135 U/g_{M_s}. Já o resultado do segundo perfil de temperaturas gerado esteve de acordo com o previsto, gerando cerca de 130 U/g_{M_s} de endoglucanase ao final das 42 horas do processo.

Notou-se que existe uma chance de cerca de 20% de que os experimentos não evoluam conforme o esperado. Por outro lado, um modelo capaz de prever a evolução do crescimento com tal precisão será de grande utilidade na descrição comportamental de biorreatores de maior porte.

3.6. CONCLUSÕES

Neste capítulo foi desenvolvido um modelo matemático cujo objetivo era realizar melhorar a produção de endoglucanase através de variações na temperatura do processo. Foi verificado que o microrganismo se desenvolve melhor para produzi-las em temperaturas constantes. A principal consequência dessa observação é que o sistema de controle da temperatura do processo deverá ser muito eficiente na eliminação dos erros ao longo do processo.

Mesmo que o terceiro objetivo estabelecido não tenha sido alcançado, a modelagem matemática do processo mostrou robusta para prever o resultado no crescimento e produção de enzimas frente a possíveis variações da temperatura no processo. Esse tipo de resultado em si já apresenta um ganho em termos de modelagem matemática do processo, pois trata-se de um modelo capaz de representar as diversas fases do crescimento microbiano, sem apresentar descontinuidades na solução numérica do problema. Mesmo que nesse trabalho não tenha sido possível encontrar algum perfil de temperaturas que aumentasse a produção da enzima escolhida, ainda é possível para outro processo a hipótese seja verdadeira. Desse modo, o modelo poderá ser útil para trabalhos futuros. Salienta-se que, com o uso da restrição na velocidade da morte celular, não foi necessário aumentar o número parâmetros/equações para se descrever os efeitos da temperatura na viabilidade do microrganismo cultivado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C. Evolutionary operation as a tool of optimization for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 149-155, Mar 2003. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000180950500008 >.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The Fungi**. Academic Press, 2001. 588 p.

COLEMAN, T. F.; LI, Y. Y. An interior trust region approach for nonlinear minimization subject to bounds. **Siam Journal on Optimization**, v. 6, n. 2, p. 418-445, May 1996. ISSN 1052-6234. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1996UL29000009 >.

COSTA, L.; OLIVEIRA, P. Evolutionary algorithms approach to the solution of mixed integer non-linear programming problems. **Computers & Chemical Engineering**, v. 25, n. 2-3, p. 257-266, Mar 15 2001. ISSN 0098-1354. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000167950000005 >.

COURI, S.; DE FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Revista De Microbiologia**, v. 26, n. 4, p. 314-317, Oct-Dec 1995. ISSN 0001-3714. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1995UC48000013 >.

DALSENTER, F. et al. A mathematical model describing the effect of temperature variations on the kinetics of microbial growth in solid-state culture. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 801-807, FEB 2005 2005. ISSN 1359-5113.

DE CASTRO, A. M.; CASTILHO, L. R.; GUIMARES FREIRE, D. M. Multivariate Optimization and Supplementation Strategies for the Simultaneous Production of Amylases, Cellulases, Xylanases, and Proteases by *Aspergillus awamori* Under Solid-State Fermentation Conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 3, p. 1588-1602, Feb 2015. ISSN 0273-2289. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000349398800026 >.

EL-BAKRY, M. et al. From Wastes to High Value Added Products: Novel Aspects of SSF in the Production of Enzymes. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 18, p. 1999-2042, Sep 17 2015. ISSN 1064-3389. Disponível em: <<Go to ISI>://CCC:000356421300002 >.

FARINAS, C. S. et al. Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 1186-1192, Jul 2011. ISSN 0926-6690. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000293320100056 >.

GASIOREK, E. Effect of operating conditions on biomass growth during citric acid production by solid-state fermentation. **Chemical Papers**, v. 62, n. 2, p. 141-146, Apr 2008. ISSN 0366-6352. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000253753700003 >.

GELMI, C.; PEREZ-CORREA, R.; AGOSIN, E. Modelling Gibberella fujikuroi growth and GA(3) production in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 9, p. 1033-1040, Apr 2002. ISSN 1359-5113. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000174665200013 >.

HAMIDI-ESFAHANI, Z. et al. A two-phase kinetic model for fungal growth in solid-state cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36, n. 2, p. 100-107, Sep 2007. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000249671100005 >.

HAMIDI-ESFAHANI, Z.; SHOJAOSADATI, S.; RINZEMA, A. Modelling of simultaneous effect of moisture and temperature on A-niger growth in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, n. 3, p. 265-272, NOV 2004 2004. ISSN 1369-703X.

KUMAR, S. et al. Use of evolutionary operation (EVOP) factorial design technique to develop a bioprocess using grease waste as a substrate for lipase production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 7, p. 4909-4912, Apr 2011. ISSN 0960-8524. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000288637000046 >.

LEKANDA, J. S.; PEREZ-CORREA, J. R. Energy and water balances using kinetic modeling in a pilot-scale SSF bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1793-1802, Jul 2004. ISSN 1359-5113. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000223089500062 >.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959. ISSN 0003-2700. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1959WC85400035 >.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. **Solid-State Fermentation Bioreactors**. Springer-Verlag, 2006. 480p.

RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, D. E. et al. The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10657-10662, 2011. ISSN 0960-8524. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411012168> >.

SARGANTANIS, J. et al. EFFECT OF OPERATING-CONDITIONS ON SOLID SUBSTRATE FERMENTATION. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, n. 2, p. 149-158, Jun 1993. ISSN 0006-3592. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1993LD11000001 >.

SAUCEDO-CASTANEDA, G. et al. Heat-Transfer Simulation in Solid Substrate Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, n. 8, p. 802-808, Apr 1990. ISSN 0006-3592. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1990CW04800007 >.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering**. Prentice Hall, 2002. 553.

SINGH, B.; KUMAR, R.; AHUJA, N. Optimizing drug delivery systems using systematic "Design of experiments." Part I: Fundamental aspects. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 22, n. 1, p. 27-105, 2005 2005. ISSN 0743-4863. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000226954300002 >.

SMITS, J. P. et al. The influence of temperature on kinetics in solid-state fermentation. v. 22, n. 1, p. 50-57, January 1998 1998. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00103-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00103-8) >.

SZEWCZYK, K.; MYZKA, L. THE EFFECT OF TEMPERATURE ON THE GROWTH OF ASPERGILLUS-NIGER IN SOLID-STATE FERMENTATION. **Bioprocess Engineering**, v. 10, n. 3, p. 123-126, MAR 1994 1994. ISSN 0178-515X.

4. CONTROLE DE UM PROCESSO DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO: UMA ANÁLISE DO DESEMPENHO ENTRE DIFERENTES METODOS.

4.1. INTRODUÇÃO

A fermentação em estado sólido (FES) é caracterizada pelo cultivo de microrganismos em meios sem água livre. A ausência de água livre no meio dificulta a remoção do calor produzido devido aos baixos coeficientes de trocas térmicas do meio, o que, conseqüentemente, prejudica a controlabilidade e a reprodutibilidade do processo (Schutyser *et al.*, 2003). Os métodos utilizados para remoção de calor dependem do tipo de biorreator utilizado. Para produção de enzimas, os mais encontrados na literatura são os do tipo bandeja e os do tipo tambor rotativo/agitado (Mitchell *et al.*, 2006).

Em biorreatores de bandeja, o controle da temperatura é realizado através de pulsos periódicos na pressão ambiente. Com o aumento da pressão, o ar é forçado para o interior do meio, promovendo as trocas térmicas necessárias para a manutenção de sua temperatura dentro de uma faixa pré-estabelecida (He e Chen, 2013). Contudo, as soluções mecânicas para esse tipo de projeto demandam uma vedação adequada para suportar até 300 kPa nas variações da pressão interna do biorreator. Já para biorreatores do tipo tambor, agitado ou rotativo, o mais comum é o uso do resfriamento pelas paredes (RP) e do resfriamento evaporativo (RE) (Nagel *et al.*, 2001b). Salienta-se que, caso seja de interesse desenvolver processos contínuos, os tambores rotativos/agitados horizontais são mais adequados para a condução do fluxo de massa (Van De Lagemaat e Pyle, 2004). Com isso, contando com uma mecânica mais simples de ser desenvolvida, aliada à possibilidade de desenvolvimento de um futuro biorreator contínuo, o biorreator do tipo tambor agitado foi o escolhido para esse trabalho.

O RE tem sido apontado como o método mais indicado para o controle da temperatura em biorreatores de grande volume. Esse método consiste na passagem de altos fluxos de ar, com baixa umidade relativa, por cima ou através do substrato para que um determinado volume de água seja evaporado. Conseqüentemente, o meio perde calor, mas também certa quantidade de água que precisará ser repostada (Sargantanis *et al.*, 1993; Nagel *et al.*, 2001a; Von Meien e Mitchell, 2002). A predominância do RE sobre o RP depende do volume do biorreator, e

também, da relação comprimento/diâmetro (C/D) do mesmo. Segundo Nagel *et al.* (2001b), o resfriamento por condução através das paredes do biorreator é eficiente para biorreatores com volumes de até 5m³ com relação comprimento/diâmetro de 15/1. Considera ainda que, para tais volumes o biorreator deve possuir uma camisa hidrotérmica a fim de melhorar as transferências de calor do meio interno para o meio externo do biorreator.

Dadas as tecnologias apropriadas para a remoção de calor, outro ponto de interesse é o controle da temperatura do processo. Mais do que isso, é como o sistema de controle reage aos distúrbios causados pelo crescimento microbiano e aos ruídos inerentes a processos multifásicos como a FES. O controle por realimentação é um procedimento que melhora o desempenho e a estabilidade do processo frente aos distúrbios, que serão compensados pelas ações do controlador (Mitchell *et al.*, 2006).

Os controladores Proporcional-Integral-Derivativo são utilizados na maior parte das malhas de controle industriais existentes. De fato, a ação derivativa não é comumente utilizada, fazendo com que os controladores PI's sejam os mais utilizados. (Astrom e Hagglund, 2001). Uma das características mais relevantes dos compensadores PI's é sua capacidade de zerar o erro de regime permanente para referências estáticas (Ogata, 1997). As técnicas mais recentes para o ajuste dos parâmetros são baseadas em modelos, que geralmente estão atreladas a erros de modelagem. Considerando o controle da temperatura de um processo de FES, no qual a temperatura varia ao longo do meio e a dinâmica microbiana varia ao longo do processo e de batelada para batelada, esses controladores são capazes de lidar com o problema? Nesse caso, além de um desempenho adequado para o processo, o controlador precisa ser robusto às possíveis variações do processo (Li, 2013). Para o controle de biorreatores de FES, os PID's têm sido utilizados somente como medida de comparação com outras técnicas. Além disso, não foram explorados métodos de ajuste dos parâmetros além do Ziegler-Nichols (Von Meien *et al.*, 2004; Sukumprasertsri *et al.*, 2013).

Outra técnica de controle bastante utilizada são os controladores preditivos baseados em modelos, os quais são empregados principalmente em sistemas com múltiplas variáveis (Seborg *et al.*, 2010). Os modelos empregados nas previsões realizadas por esses controladores são calculados a partir da resposta a impulsos ou a degraus aplicados nas entradas dos processos estudados. Fazendo-se uso desses modelos, é possível prever os efeitos causados nas saídas da planta por variações nas entradas. Também é possível prever os efeitos de um distúrbio no processo a fim de compensá-lo apropriadamente de modo que a saída sempre siga a referência do processo (Seborg *et al.*, 2010). No caso de FES, tendo sido modeladas as transferências de

calor no interior do biorreator e ajustado um modelo que descreva o crescimento microbiano com alguma precisão, o controlador será sensível a futuros distúrbios na temperatura, pois gerará ações capazes de minimizar os efeitos dos distúrbios (Sargantanis *et al.*, 1993; Saucedocastaneda *et al.*, 1994; Viccini *et al.*, 2001; Stuart e Mitchell, 2003; Lekanda e Perez-Correa, 2004; Von Meien *et al.*, 2004). Por outro lado, caso os modelos não sejam precisos ou a dinâmica do crescimento tenha variado além do previsto, o controlador preditivo não será capaz de acompanhar a referência. Nesses casos, uma realimentação de saída pode corrigir esses desvios, procedimento conhecido como correção de desvios.

Visto que as técnicas de controle apresentadas têm ampla utilidade no controle de processos, o objetivo desse capítulo é avaliá-las a fim de se verificar qual apresenta o melhor desempenho frente a dois tipos de referências de temperatura. Foram testadas uma fixa e outra variante com o tempo. Os ajustes dos parâmetros dos controladores foram realizados através da simulação de um modelo de crescimento microbiano associado a um modelo adaptado para o biorreator utilizado (Lekanda e Perez-Correa, 2004). O ajuste dos parâmetros do modelo do biorreator foi realizado através da resposta a pulsos por tempo definido no aquecedor do processo.

4.2. PROCESSO DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Para verificação dos sistemas de controle propostos, foi empregado o biorreator do tipo tambor agitado desenvolvido nesse trabalho. A massa seca de farelo de trigo lavado, substrato utilizado em todos os experimentos, foi de aproximadamente 600 gramas. O substrato foi suplementado com 337 mL de solução nutriente de Sulfato de Amônio 0,91% em HCl 0,1 M e complementado com mais 820mL de água, de modo que a umidade do meio fermentativo fosse de cerca de 66% em base úmida, ou 1,94/1 (m_a/m_s).

O farelo foi lavado em água corrente até que a mesma não possuísse mais modificações de cor, indicando que o amido foi removido. Após a lavagem, o farelo foi secado em estufa com circulação forçada de ar com temperatura de 85°C durante as primeiras duas horas e a 70°C até que a umidade do meio estivesse com uma relação entre 0,9/1,0 e 1,1/1,0 de massa de água por massa seca.

4.3. MODELO MATEMÁTICO DO BIORREATOR

O controle de processos consiste basicamente na manipulação de variáveis de entrada para que as saídas tenham um comportamento desejado mesmo que existam distúrbios não medidos no sistema. Para se alcançar tal objetivo, primeiramente é necessário compreender como as saídas se comportam frente a alterações nas entrada (Whan Sung *et al.*, 2009). As três formas mais empregadas para se identificar esses comportamentos são a aplicação de entradas do tipo degrau, rampa e pulso retangular. Cada uma dessas entradas é utilizada conforme as características do processo em estudo (Seborg *et al.*, 2010). Para processos que levam várias horas para se estabilizar, o uso da resposta ao impulso diminui o tempo da identificação pela metade, quando comparado com a resposta ao degrau, tornando-se atrativo quando modelos para representa-lo já estão disponíveis.

Para identificação do comportamento da temperatura no biorreator desenvolvido, foram utilizadas entradas do tipo pulso retangular no aquecedor do processo, com manutenção de uma potência de 200 W durante 60 minutos e posterior desligamento da mesma. Um modelo do tipo caixa preta foi empregado para descrever as variações da temperatura em vários pontos do biorreator, a diversas condições operacionais. As temperaturas medidas foram: da cuba, do ar de entrada, do ar de saída e do meio de cultivo. O equacionamento utilizado foi uma adaptação de modelos de biorreatores aplicados em trabalhos anteriores (Stuart e Mitchell, 2003; Lekanda e Perez-Correa, 2004), acrescido de um modelo para o aquecimento da parede externa do biorreator e do fluxo de ar que o alimenta, conforme Equações de (4.1) a (4.4)

Na Equação (4.1) é considerado o balanço de energia entre o ambiente interior da cuba e o ar do ambiente externo. São consideradas partes integrantes do ambiente interno da cuba: o ar interno, todo o conjunto do biorreator, a mesa de suporte e a própria cuba. A ambiente interno aquecido por uma resistência elétrica, definida na equação por Q_P . O termo Q_0 é referente à potência residual gerada por três ventiladores que ficam constantemente ligados com o objetivo de homogeneizar a temperatura no interior da cuba e do motor de passo do eixo do biorreator.

A Equação (4.2) representa a temperatura do ar que alimenta o biorreator. Os valores medidos para ambas temperaturas do ambiente externo do biorreator e a temperatura do ar que o alimenta foram bastante semelhantes. Por esse motivo, as dinâmicas da temperatura do ar da cuba e a temperatura do ar que alimenta o biorreator foram consideradas iguais. As maiores diferenças obtidas foram devido à localização do sensor que mede a temperatura da cuba, que

não foi diferente entre alguns experimentos. Essas diferenças foram consideradas como incertezas do modelo durante o desenvolvimento dos sistemas de controle.

Na Equação (4.3) é calculada a temperatura do ar no interior do biorreator, em função da energia trocas térmicas com a parede desse e com o ar que o alimenta.

$$\frac{dT_o}{dt} = \frac{1}{C_{pg}G_c + C_{pc}M_c + C_{pb}M_b + C_{pa}M_a + C_{pm}M_m} (Q_p + Q_0 - h_{oe}A_{oe}(T_o - T_{ext})) \quad (4.1)$$

$$\frac{dT_{in}}{dt} \cong \frac{dT_o}{dt} \quad (4.2)$$

$$\frac{dT_a}{dt} = \frac{1}{(C_{pg} + C_{ph}X_{ga})G_b} \begin{pmatrix} T_{in}F_{in}(C_{pg} + C_{ph}X_{gi}) \\ -T_aF_{in}(C_{pg} + C_{ph}X_{ga}) \\ +h_{sa}A_{sa}(T_m - T_a) \end{pmatrix} \quad (4.3)$$

$$\frac{dT_m}{dt} = \frac{1}{(C_{pm} + C_{pw}M_W)M_s + C_{pb}M_b} \begin{pmatrix} Q_{Co_2} \\ -F_{in}H_v(X_{gi} - X_{go}) \\ -h_{sa}A_{sa}(T_m - T_a) \\ -h_{so}A_{so}(T_m - T_o) \end{pmatrix} \quad (4.4)$$

Na Equação (4.4), Q_{Co_2} é o calor gerado pela respiração microbiana, onde $Q_{Co_2} = \frac{1}{6}r_{Co_2}\Delta\hat{H}_{C_6H_{12}O_6}$ e r_{Co_2} é a taxa de CO_2 produzida pela respiração microbiana em $mmol/h$, $\Delta\hat{H}_{C_6H_{12}O_6} \cong 1768kJ/mol_{glucose}$ é a quantidade de energia convertida em calor por mol de glicose. Dada a estequiometria da respiração microbiana, Equação (4.5), basicamente $1099kJ$ são convertidos em ATP, de modo que para cada $1 mol_{Co_2}$ produzido, cerca de $294,7kJ$ torna-se calor adicionado ao substrato.



Os parâmetros Q_0 e h_{oe} da Equação (4.1) foram calculados para ajustar a resposta da temperatura do ambiente externo em função da aplicação de um impulso de 200W por 60 minutos no aquecimento do biorreator. A estimativa inicial para cada um foi de: $72kJ/h < Q_0 < 216kJ/h$ e $h_{oe} > 72kJ/h$. No caso de h_{oe} , esse valor inicial foi levantado considerando-se apenas a troca térmica das paredes da cuba com o ambiente exterior, mas não foram considerados as trocas com a mesa de mármore que suporta o biorreator, tampouco a abertura lateral existente na cuba para amostragem e fixação da sonda de temperatura. Desse modo, não foi possível de se ter certeza acerca da influência exata de cada um dos elementos responsáveis pelas trocas térmicas desta equação. Contudo, para melhorar as estimativas do modelo, foi

admitido que h_{oe} podia apresentar valores diferentes durante o aquecimento e a refrigeração da cuba.

A estimativa dos parâmetros ocorreu em duas etapas: 1- identificação do modelo de aquecimento e refrigeração da cuba; 2- identificação dos modelos de aquecimento e refrigeração do ar da fase gasosa do biorreator e da temperatura do meio fermentativo. Para a identificação dos parâmetros da segunda etapa, os dados da temperatura da cuba foram utilizados. Esse passo foi necessário, pois não foi possível considerar durante a modelagem da cuba os distúrbios apresentados durante as medições experimentais. Para estima-los, foi utilizado o comando *nlgrey* do *Matlab*TM, utilizando a metodologia de busca de *Levenberg-Marquadt*, a fim de se ajustar as respostas obtidas experimentalmente ao modelo.

Os resultados obtidos, considerando que a área total de transferência de calor entre a cuba e o ambiente externo (A_{oe}) é de $1,02 \text{ m}^2$, foram: $Q_0 = 192 \left[\frac{\text{kJ}}{\text{h}} \right]$, $h_{oe} = \begin{cases} 34,3, & T_m(k) < T_m(k-1) \\ 40,4, & T_m(k) \geq T_m(k-1) \end{cases} \left[\frac{\text{kJ}}{\text{m}^2\text{Kh}} \right]$. Para a Equação (4.3), tem-se $h_{sa} = 0,16 + 0,10R + 0,82F \left[\frac{\text{J}}{\text{m}^2\text{Kh}} \right]$, em (4.4) $h_{so} = \begin{cases} h_{so_1}, & T_m(k) < T_m(k-1) \\ h_{so_2}, & T_m(k) \geq T_m(k-1) \end{cases}$, onde $h_{so_1} = 64,86 + 0,965F + 0,889R \left[\frac{\text{kJ}}{\text{m}^2\text{Kh}} \right]$ e $h_{so_2} = 84,24 - 0,143F + 4,645R \left[\frac{\text{kJ}}{\text{m}^2\text{Kh}} \right]$ e, sendo que R é dado em rotações por hora e F em litros por hora. O termo H_v é o calor de vaporização da água e é assumido como sendo 2421 kJ/kg , valor do mesmo a 34°C . Esse valor é assumido constante para toda a faixa operacional do biorreator, pois varia entre 2440 kJ/kg e 2400 kJ/kg de 27°C e 40°C (Stuart e Mitchell, 2003).

4.3.1. Modelo Matemático do Processo Fermentativo

Para prover informações acerca da respiração microbiana e, conseqüentemente, da geração de calor durante a modelagem do processo, as Equações de (3.1) a (3.8) foram empregadas em conjunto com seus respectivos parâmetros. É importante considerar que biorreator do tipo tambor agitado que é empregado nos estudos deste Capítulo é conceitualmente diferente do biorreator de colunas (leito agitado versus leito fixo). Essa diferença pode levar a dinâmicas de crescimento distintas entre ambos, e por isso, durante a fase de simulações das estratégias de controle, variações nos valores dos parâmetros foram consideradas para avaliar a robustez de cada estratégia de controle.

4.4. ESTRATÉGIAS DE CONTROLE

As variáveis controladas nesse trabalho são: a temperatura da parede externa, a agitação do meio e a taxa de aeração do biorreator. A saída controlada é a temperatura do meio. Foi observado durante experimentos preliminares que as taxas de aeração utilizadas não influenciaram significativamente na umidade do meio. Nesses experimentos, a umidade do meio foi medida no seu início, cerca de 1,93 (m_a/m_s), e após 24 horas, com o fluxo de ar de 3,2 e 10LPM (litros por minuto), resultando respectivamente em 1,91 (m_a/m_s) e em 1,87 (m_a/m_s).

Considerando estudos prévios acerca da sensibilidade à agitação do gênero de microrganismo utilizado, constatou-se que agitações entre 0,5 e 3 RPM não afetam negativamente nem seu crescimento, nem a produção de metabólitos (Stuart *et al.*, 1999; Gasiorek, 2008; Sukumprasertsri *et al.*, 2013). Desse modo, para auxiliar no controle da temperatura do meio fermentativo, a velocidade de agitação foi definida como sendo proporcional aos desvios da temperatura do processo com relação à referência. Já para as taxas de aeração, um controlador Proporcional-Integral foi utilizado. As Equações (4.6) e (4.7) mostram essas regras para a agitação e para a aeração, respectivamente.

$$\Omega(h^{-1}) = 30 + 42|e(t)| \quad (4.6)$$

$$F(Lh^{-1}) = 144 - 180 \left(e(t) + \frac{1}{60} \int_0^t e(t) \right) \quad (4.7)$$

Onde $|e(t)| = |T_{ref} - T_m|$ e $e(t) = T_{ref} - T_m$.

Para a agitação, o mínimo estabelecido foi de 0,5 RPM atingindo 3 RPM para um erro de 3,57°C. O erro absoluto foi considerado, pois agitações maiores facilitam as trocas térmicas no meio. Já para a aeração, o mínimo estabelecido foi de 2,4 litros por minuto, aumentando-se proporcionalmente à diminuição do erro a uma velocidade de 3 L/min para cada 1°C. O integrador foi utilizado para auxiliar no controle da temperatura do meio, aumentando o fluxo de ar enquanto a temperatura do meio fosse maior do que a referência. O sinal negativo na Equação (4.7) se deve ao sinal negativo da temperatura do meio no cálculo do erro. Nota-se ainda que, devido às limitações da instrumentação utilizada, a agitação e o fluxo de ar estão limitados, respectivamente, entre 30 e 180 RPH (rotações por hora) e 144 e 600 L/h, as constantes de tempo do processo variam em 50%. Portanto, robustez foi um dos requisitos de controle.

4.4.1. Ajuste dos Parâmetros do Controlador PI

Para o controle da temperatura do processo foram avaliadas quatro metodologias de ajuste dos parâmetros: Ziegler-Nichols (ZN), Tyreus-Luyben (TL) (ZN modificado com o objetivo de limitar as ações de controle do primeiro), IMC e SIMC. O método de ZN foi utilizado por sua importância histórica, enquanto o TL foi pelas mudanças introduzidas em ZN. Skogestad (2003) apresentou as metodologias IMC e SIMC, nas quais os parâmetros são calculados em função da resposta do processo baseados no método da síntese direta, o que traz grande facilidade no cálculo dos parâmetros do controlador. Para ZN e TL, os parâmetros são calculados para o menor ganho de uma realimentação proporcional que leva a saída à uma oscilação constante, sendo esse ganho chamado de K_u e o período de oscilação de P_u (Seborg *et al.*, 2010). O tempo morto do processo foi considerado de 15 minutos para todos os experimentos, devido ao período de amostragem, uma vez que que foi a única informação referente ao mesmo. Os demais parâmetros foram calculados através do modelo. As Equações de (4.8) a (4.11), da Tabela 4.1, mostram as regras de ajuste para cada método, onde K_c é o ganho proporcional do controlador e T_I é o seu tempo de integração.

Tabela 4.1: Regras para ajustes dos parâmetros de um controlador PI

Ziegler-Nichols:	$K_c = 0,45K_u$	$T_I = \frac{P_u}{1,2}$	(4.8)
Tyreus-Liuben:	$K_c = 0,313K_u$	$T_I = 2,2P_u$	(4.9)
IMC:	$K_c = \frac{0,588 \left(\tau_1 + \frac{\theta}{2} \right)}{k_p \theta}$	$T_I = \tau_1 + \frac{\theta}{2}$	(4.10)
SIMC:	$K_c = \frac{1}{k_p} \frac{\tau_1}{\tau_c + \theta}$	$T_I = \min[\tau_1, 4(\tau_c + \theta)]$	(4.11)

O ganho da planta é dado por: $k_p = A/P$, onde A é a amplitude de deslocamento da temperatura desde $P = 0W$ até a acomodação da mesma para $P = 100W$ resultando em $k_p = 0,091^\circ C/W$. Para o caso em estudo, o processo pode ser considerado do tipo primeira ordem com tempo morto. Assim, foi adotado que a constante de tempo do processo fosse o tempo em que a saída demora para alcançar 63,2% de sua amplitude a partir da ação na entrada, desse modo $\tau_1 = 1,3 h$ (Ogata, 1997; Dorf e Bishop, 2006; Seborg *et al.*, 2010). O tempo de atraso do processo foi de aproximadamente 1 tempo de amostragem, ou seja, $\theta = 15 min$, ou $\theta = 0,25 h$, sendo que, na maioria dos casos, possivelmente ocorreu devido à falta de sincronização

entre o acionamento do aquecimento e a amostragem da sonda. De acordo com as regras de ajuste SIMC, o valor adequado para a constante de tempo do processo em malha fechada deve ser $\tau_c = \theta$ (Skogestad, 2003). Já para os controladores ZN e TL, de acordo com as simulações realizadas, $K_u = 112 W/^\circ C$ e $P_u = 1,5h$. Na Tabela 2 são mostrados os valores calculados dos parâmetros do controlador para os diferentes métodos em estudo.

Tabela 4.2: Resultado do ajuste dos parâmetros para diferentes metodologias.

ZN:	$K_c = 58,5 (W/^\circ C)$	$T_I = 1,25 (h)$
TL:	$K_c = 40,6 (W/^\circ C)$	$T_I = 3,30 (h)$
IMC:	$K_c = 36,5 (W/^\circ C)$	$T_I = 1,43 (h)$
SIMC:	$K_c = 28,9 (W/^\circ C)$	$T_I = 1,30 (h)$

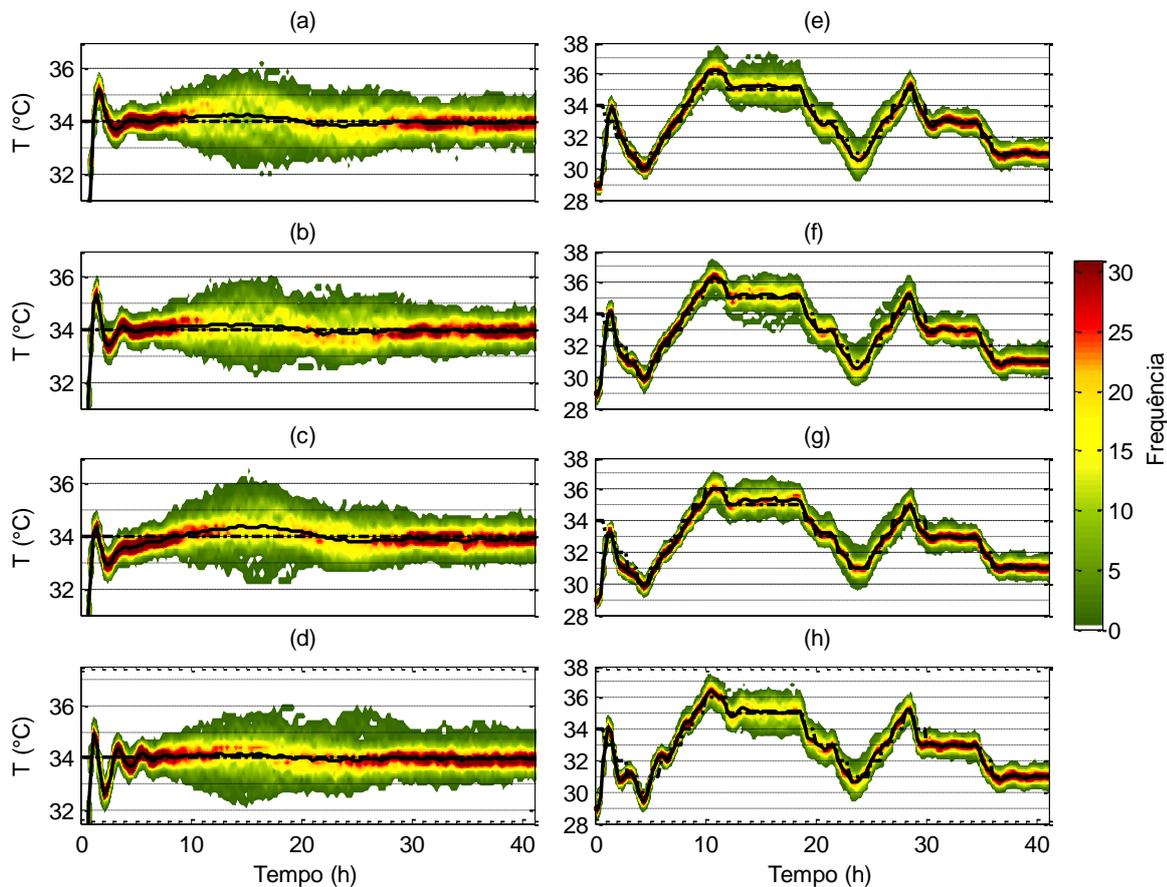
4.4.1.1. Critérios para Escolha dos Parâmetros

Considerou-se que um sistema de controle adequado deve ser capaz de lidar com três requisitos: rejeição de distúrbios no processo, resposta a variações da referência e robustez com relação a incertezas na modelagem (Astrom *et al.*, 1998). O primeiro índice de desempenho escolhido foi avaliar média da somatória do módulo dos erros (MSME) para cada um dos métodos, definido pela Equação (4.12). A Figura 4.1 mostra a comparação entre o resultado da simulação entre as diferentes metodologias de ajuste utilizadas. Dado que para cada ciclo de amostragem no biorreator são tomadas 90 medidas de temperatura ao longo do mesmo, para aproximar o modelo do processo real, foram realizadas 90 simulações nas quais os parâmetros do crescimento são gerados aleatoriamente dentro de seus intervalos de confiança, com distribuição normal. Os controladores apresentados na Figura 4.1 são respectivamente: SIMC em (a) e (e), IMC em (b) e (f), TL em (c) e (g) e ZN em (d) e (h). Seguindo essa sequência, os resultados da SQE foram, respectivamente: a) $0,11^\circ C$, b) $0,09^\circ C$, c) $0,16^\circ C$, d) $0,06^\circ C$ para temperatura constante e e) $0,20^\circ C$, f) $0,20^\circ C$, g) $0,18^\circ C$, h) $0,22^\circ C$ para o perfil variável. Salienta-se que, quanto menor o valor do MSME, melhor o desempenho do controlador. Desse modo, o controlador ZN apresentou a melhor resposta, pois foi capaz de manter a saída mais próxima da referência, contudo apresenta tendência à oscilação durante os transitórios.

$$MSME = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n |T_{ref}(k) - T_p(k)| \quad (4.12)$$

Por outro lado, a rejeição de distúrbios do processo é fundamental para lidar com o calor gerado pelos microrganismos em biorreatores de FES. Além disso, o distúrbio gerado pela atividade biológica apresenta características de realimentação positiva nas proximidades das temperaturas estudadas. Isso quer dizer que, ao se aumentar a temperatura do processo os microrganismos tendem a crescer mais rapidamente, gerando mais calor; ao se diminuir, crescem mais vagarosamente, gerando menos calor. Com essas características associadas às incertezas da modelagem, surge a necessidade de se avaliar quantitativamente a estabilidade do processo em malha fechada.

Figura 4.1: Resposta simulada da temperatura no meio fermentativo para dois tipos de referência. A graduação de cores indica a frequência com que uma determinada temperatura foi amostrada e a linha preta tracejada indica a trajetória da referência. Nas Figuras de (a) a (d) a referência é constante, enquanto nas demais foi utilizado o Perfil 3 de temperaturas mostrado na Figura 3.3.



A Figura 4.1 foi elaborada pelo autor da tese.

Os conceitos de Margem de Ganho (GM) e Margem de Fase (PM) proporcionam medidas úteis para a robustez do processo. A margem de ganho indica o quanto o ganho do processo (k_p) ou o ganho do controlador (K_c) podem aumentar sem que a malha realimentada se torne instável, apresentadas nas Equações (4.13) e (4.14). A margem de fase indica o quanto

o tempo morto do processo pode aumentar sem que a malha fechada se torne instável (Seborg *et al.*, 2010). Ainda assim, esses indicadores não são isentos de falhas.

Outros dois conceitos precisam ser adicionados à análise da estabilidade: a Função Sensibilidade (S), e a Função Sensibilidade Complementar (T), cujos máximos são utilizados para verificação das margens de estabilidade (Seborg *et al.*, 2010). As Equações de (4.15) e (4.16) apresentam, respectivamente, as funções S e T. Também devem ser considerados M_S e M_T , Equações (4.17) e (4.18) que são os máximos das funções S e de T, os quais indicam um compromisso entre robustez e performance. Segundo (Seborg *et al.*, 2010), um sistema de controle deve apresentar $1,0 < M_T < 1,5$ e $1,2 < M_S < 2,0$ para que apresente tanto um o acompanhamento da trajetória, quanto uma rejeição de distúrbios adequados. Valores fora dessa faixa podem gerar instabilidade ou baixos coeficientes de amortecimento da saída frente às incertezas do processo.

$$GM \stackrel{\text{def}}{=} \frac{1}{|G_{mf}(j\omega)|} \quad (4.13)$$

$$PM \stackrel{\text{def}}{=} 180 + \phi \quad (4.14)$$

$$S \stackrel{\text{def}}{=} \frac{1}{1 + G_c G} \quad (4.15)$$

$$T \stackrel{\text{def}}{=} \frac{G_c G}{1 + G_c G} \quad (4.16)$$

$$M_S \stackrel{\text{def}}{=} \max_{\omega} |S(j\omega)| \quad (4.17)$$

$$M_T \stackrel{\text{def}}{=} \max_{\omega} |T(j\omega)| \quad (4.18)$$

Margem de ganho e margem de fase são calculados no domínio da frequência, ou seja, dada a função de transferência do processo, faz-se $s = j\omega$, com $\omega \in [0, \infty)$. Desse modo, variando-se ω calcula-se $|G_{mf}(j\omega)| = \left| \frac{G_c G}{1 + G_c G} \right|$. A margem de fase é definida pela Equação (4.14) para a fase ϕ quando $|G_{mf}(j\omega)| = 1$. A margem de ganho é o inverso da magnitude de $|G_{mf}(j\omega)|$ na frequência ω em que o ângulo da fase seja $\phi = -180^\circ$. Ambos os ganhos são facilmente calculados utilizando o comando *margin* do *Matlab*[®] para a função de transferência de malha fechada, definida e pela (4.15) para distúrbios no processo e pela Equação (4.16) para

variações da referência. M_S e M_T foram calculados utilizando a norma da parte imaginária e real retornadas pela função *nyquist* do *Matlab*[®] para S e T. G_c é a função de transferência do controlador PI e G é a função de transferência do processo, respectivamente as Equações (4.21) e (4.22). Onde K_c e T_I são os ganhos do controlador, k_p e τ_p o ganho e a constante de tempo da função de transferência que representa as trocas térmicas através da parede do biorreator.

$$G_c = \frac{K_c T_I s + 1}{T_I s} \quad (4.21)$$

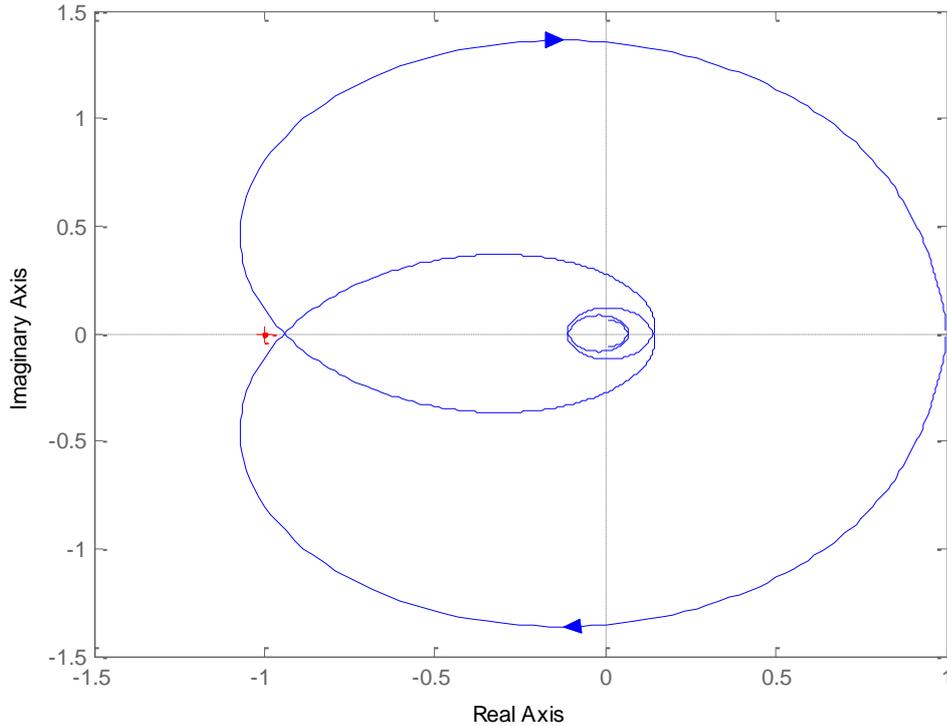
$$G = \frac{k_p e^{-0,25s}}{\tau_p s + 1} \quad (4.22)$$

A Tabela 4.3 mostra a GM, M_T e M_S para cada um dos controladores estudados, considerando que a constante de tempo do processo, τ_p , pode variar entre 1,3 e 1,9 hora, com ganho $0,075 < k_p < 0,110$ °C/W dependendo das condições de agitação e aeração do mesmo. Os valores de GM, M_T e M_S foram calculados para os quatro pontos assinalados e na Tabela 4.3 estão mostradas as faixas obtidas para essas condições. A Figura 4.2 mostra o diagrama de Nyquist para a condição de controle em que a curva esteve mais próxima de $-1 + 0j\omega$. Como pode ser observado, todos os controladores apresentam margem de ganho suficiente para serem estáveis. Verifica-se, no entanto, que a margem e ganho para os controladores ZN, TL e IMC são bastante restritas. Já para a estabilidade relativa, somente o SIMC apresenta resultados dentro da faixa estabelecida de M_S e M_T para as quatro condições avaliadas. Portanto, o controlador a ser utilizado para o caso em estudo é o SIMC, visto que assegura a estabilidade do processo mesmo com as incertezas da modelagem.

Tabela 4.3: Faixa calculada para a margem de ganho e para os indicadores de estabilidade para as metodologias avaliadas, considerando-se a variação do ganho e da constante de tempo do processo.

	MG	M_T	M_S
ZN:	0,23~1,12	1,45~5,25	2,16~6,08
TL:	0,24~3,95	3,83~84,95	2,95~85,90
IMC:	0,72~1,92	1,09~1,89	1,89~2,69
SIMC:	1,41~3,11	1,02~1,15	1,43~1,88

Figura 4.2: Diagrama de *Nyquist* para a condição de controle com menor distância para o ponto $-1 + 0j\omega$.



A Figura 4.2 foi elaborada pelo autor da tese.

4.4.2. Controlador Preditivo Baseado em Modelo

A ideia da lei de controle para esse tipo de controlador é a minimização dos erros existentes entre a saída prevista pelo modelo do processo e a trajetória da referência ao longo de um determinado horizonte de previsão. Os erros previstos são definidos pelo vetor coluna $\hat{\mathbf{E}}(n) \triangleq \text{col}(\hat{e}(k+1), \hat{e}(k+2), \dots, \hat{e}(k+R))$, definido pela Equação (4.23), onde n representa horizonte de erros previstos e k representa o instante atual do processo (Seborg *et al.*, 2010).

$$\hat{\mathbf{E}}(n) = \mathbf{r}_f(n) - \tilde{\mathbf{Y}}^o(n) \quad (4.23)$$

Sendo que $\tilde{\mathbf{Y}}^o(n)$ é o vetor da resposta não forçada do modelo, ou seja, considerando o modelo utilizado, mantêm-se o último valor de Q_P da Equação (4.1) e as últimas condições do processo para as demais variáveis e simula-se o processo até o horizonte de previsão (Seborg *et al.*, 2010). $\mathbf{r}_f(n)$ é o vetor que representa a referência da variável controlada ao longo do processo.

Neste intervalo são calculados os efeitos do crescimento microbiano, da agitação, da aeração e da temperatura da parede externa do biorreator na temperatura do meio fermentativo.

Na Figura 4.3 é mostrado um diagrama genérico de um controlador preditivo, sendo que o bloco processo representa o processo experimental, enquanto os blocos modelo, estimador/preditor são basicamente a modelagem de todo o processo. Mais especificamente, no diagrama mostrado, o bloco modelo apresenta o valor da saída atual e passada em função das ações passadas de controle. O bloco estimador/preditor tem por saída a resposta não forçada do modelo. A diferença entre essa saída e a referência será utilizada para estimar as futuras ações de controle.

Figura 4.3: Diagrama genérico de um controlador preditivo baseado em modelo.

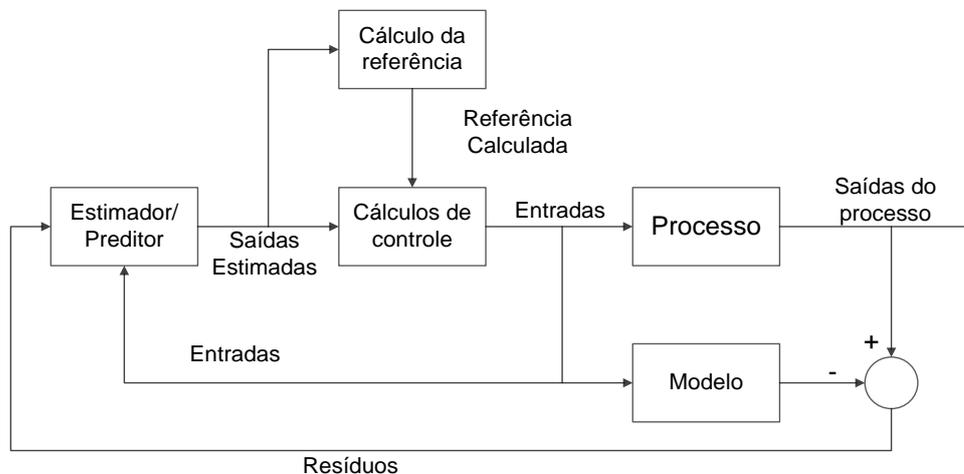


Figura adaptada de Seborg *et al.*, (2010).

As ações do controlador são calculadas e limitadas através da minimização do funcional definido pela Equação (4.24). Foram utilizadas matrizes de ponderação de modo a definir quais são os fatores mais importantes na solução do problema de controle, o erro previsto ou as ações de controle. A lei de controle que minimiza a função objetivo é definida pela Equação (4.25), onde \mathbf{S} é a matriz dinâmica, definida pela Equação (4.26). Neste trabalho, \mathbf{S} é a resposta do modelo utilizado a um degrau de 100 W no aquecedor do ambiente externo simulado nas condições médias de fluxo de ar e agitação, i.e., 1,75 RPM e 4 L/min. Os horizontes de previsão e controle foram definidos, respectivamente, por $R = 5$ h e $L = 2$ h, ou respectivamente 20 amostras e 8 amostras. O tempo de amostragem de aproximadamente 15 minutos é limitado pelo sistema de aquisição da temperatura desenvolvido neste trabalho. A lei de controle foi calculada de modo que a primeira ação do controlador fosse no máximo 100W

para $\hat{\mathbf{E}}(n) = 9^\circ\text{C}$ para os R próximos instantes de amostragem. Desse modo, fazendo-se \mathbf{Q} e \mathbf{P} matrizes identidades, tem-se que $f = 0,03$.

$$\min_{\Delta U(k)} J_u = \hat{\mathbf{E}}(n)^T \mathbf{Q} \hat{\mathbf{E}}(n) + f \Delta \mathbf{U}(n)^T \mathbf{P} \Delta \mathbf{u}(n) \quad (4.24)$$

$$\Delta \mathbf{U}(n) = (\mathbf{S}^T \mathbf{Q} \mathbf{S} + \mathbf{P})^{-1} \mathbf{S}^T \mathbf{Q} \hat{\mathbf{E}}(n) \quad (4.25)$$

$$\mathbf{S} \triangleq \begin{bmatrix} S_1 & 0 & 0 & \cdots & 0 \\ S_2 & S_1 & 0 & \cdots & 0 \\ S_3 & S_2 & S_1 & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \cdots & \vdots \\ S_R & S_{R-1} & S_{R-2} & \cdots & S_{R-L+1} \end{bmatrix} \quad (4.26)$$

Para se validar o resultado encontrado, foram realizadas diversas simulações a fim de se averiguar o desempenho e a estabilidade do sistema realimentado. Esses dados se encontram no Material Suplementar desse Capítulo (Apêndice B). Durante as simulações, outros valores para f também foram testados. Quanto menor o valor de f , melhor o desempenho obtido. Por outro lado, quando $f = 0$, os valores das ações de controle não poderiam ser reproduzidos devido às limitações do sistema experimental. Com o valor escolhido, seriam necessárias duas ações de controle para se atingir o máximo da potência de saída permitida, ou seja, 200W. Considera-se ainda, que durante as simulações, para $f < 0,3$, o sistema apresentava oscilações incompatíveis com as restrições do crescimento microbiano. Portanto, não sendo indicado a implementação de tal controlador.

Definido o ganho do controlador, salienta-se que o controlador preditivo atua iterativamente a cada nova amostragem do processo. Assim, o algoritmo 1 mostra como o mesmo foi implementado experimentalmente.

Algoritmo 1: Atuação do Controlador Preditivo no instante de tempo k

1° Passo: Agitação do meio fermentativo durante os períodos entre as amostragens da temperatura do processo;

2° Passo: Aquisição da temperatura do meio fermentativo (T_m), temperatura da ambiente externo do biorreator (T_o), temperatura do ar de entrada (T_{in}) e temperatura do ar de saída (T_a);

3° Passo: Simulação do crescimento microbiano para $t = 0:k$. Simulação dos efeitos do crescimento microbiano no modelo do biorreator nas condições operacionais (T_m, T_o, T_a, T_{in}) de $t = k + 1:k + R$, sendo que $\mathbf{Q}_P(k + 1:k + R) = \mathbf{Q}_P(k)$;

4º Passo: Cálculo do erro previsto, $\hat{E}(n)$, e cálculo das ações de controle futuras, $\Delta u(n)$.
 $Q_P(k+1) = Q_P(k) + \Delta u(1)$. Se $t \leq 42h$, retorna ao Passo 1.

4.4.3. Controlador Preditivo com Estimador Auto Ajustável

O controlador desenvolvido foi implementado no biorreator, conforme o Algoritmo 1. No início da fase de crescimento exponencial, em cerca de 10 horas do início do processo, o controlador não conseguiu compensar o aumento repentino da temperatura. Para o controlador preditivo, esse erro está relacionado com uma má estimativa do início dessa fase. Durante esse processo foi observado um erro no controle de fluxo de ar, que ficava com o fluxo de ar travado em caso de diminuição rápida de temperatura. Isso gerou uma diminuição de 3°C na temperatura do processo em cerca de 20 horas de seu início, conforme mostrado na Figura 4.4. Essa diminuição foi compensada pelo controlador. A partir da 25ª hora do processo a temperatura do meio se manteve constante a 35°C, com alguns desvios devido ao método de amostragem. Concluiu-se então, que esse desvio foi gerado porque as estimativas da biomassa presente no biorreator eram menores do que as reais.

Figura 4.4: Temperatura do processo experimental controlado por um controlador preditivo com desvio nas estimações.

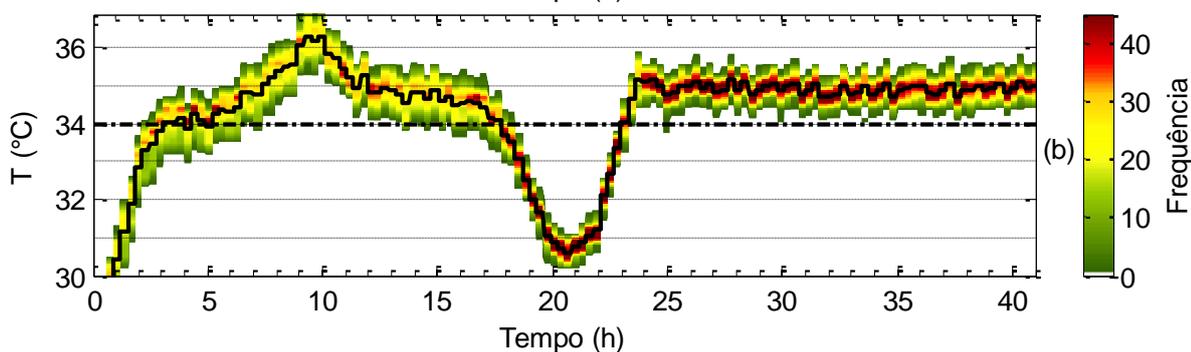


Figura elaborada pelo autor da tese.

O parâmetro da modelagem do crescimento microbiano que melhor descreve tal comportamento é o fator de máxima biomassa por massa de substrato, (X_M). Isso ocorre, pois, o mesmo tanto determina a velocidade do crescimento, quanto a máxima biomassa presente no biorreator ao longo do processo. Desse modo, foi proposto um sistema de compensação para a estimação do crescimento microbiano do tipo PI, no qual os erros da temperatura do meio indicam o quanto a estimativa do modelo precisa ser corrigida. Este sistema é baseado nos

conceitos de estimadores de estados e realimentação de estados, onde uma realimentação de saída é utilizada para redefinir a dinâmica dos estados do processo (Ogata, 1997; Chen, 1999).

A Figura 4.5 ilustra o conceito de estimação de estados em malha fechada para um sistema linear, onde a saída do processo é utilizada para realocar a dinâmica do modelo. Para o caso do processo não linear em estudo, os blocos em série b , $(sI - A)^{-1}$ e c são correspondentes ao processo experimental da Figura 4.3, enquanto os blocos destacados pelo quadrado de linhas tracejadas corresponde ao modelo/estimador do processo. O bloco l corresponde à realimentação para correção do parâmetro X_M feita pelo controlador PI. A Equação (4.27) mostra como a correção foi feita. Os índices 1 e 2 da Equação são referentes às fases de crescimento estabelecidas na modelagem do processo.

Os parâmetros do controlador PI da Equação (4.27) foram obtidos baseando-se primeiramente na dinâmica do crescimento microbiano, visando zerar qualquer erro em até dez períodos de amostragem. A combinação de valores foi simulada diversas vezes, de modo a se obter uma relação entre velocidade de correção do parâmetro e estabilidade do mesmo. Valores maiores para k_p e T_i geravam oscilações na saída do processo. Já o valor de 0,6 foi utilizado, pois no momento que o mesmo foi escolhido, pensava-se que a biomassa seria sempre menor no biorreator de tambor agitado do que nas colunas. Após a realização dos experimentos, constatou-se que essa prerrogativa não era verdadeira e que o valor ideal seria 1,0. Valor que foi corroborado pelas simulações realizadas, cujos dados não são mostrados.

$$X_{M_{1,2}} = X_{M_{1,2}}(U, T) \left(0,6 - 0,20e(k) - 0,1 \sum_{t=0}^{t=k} e(t) \right) \quad (4.27)$$

Sendo que: $e(k) = r_f(k) - Y_m(k)$ e $Y_m(k)$ é o valor da temperatura média do meio no instante k .

A Figura 4.6 mostra a simulação dos efeitos de variações no crescimento microbiano na resposta do controlador. Na Figura 4.7 (a) e (e) foi admitido um crescimento microbiano máximo, (X_M), igual ao modelo calculado no biorreator de colunas nas mesmas condições de temperatura e umidade inicial do substrato, isto é, 34°C e 66%. Na Figura 4.7 (b) e (f) foi admitido um crescimento máximo menor do que nas colunas (70% de X_M) e na Figura 4.7 (c) e (g) um crescimento máximo maior (130% de X_M). Por último, na Figura 4.7 (d) e (h), foi testado como os controladores, respectivamente o original e o auto ajustável, resolveriam o

problema de acompanhamento da trajetória para um crescimento microbiano maior do que o esperado. Na Figura 4.6 (a), (b), (c), (e), (f) e (g) são mostradas as respostas do controlador à uma referência de temperatura constante, já nas em (d) e (h) são mostradas a resposta para o acompanhamento do perfil de temperaturas proposto.

Figura 4.5: Analogia de uma estimador de estados linear com realimentação de saída.

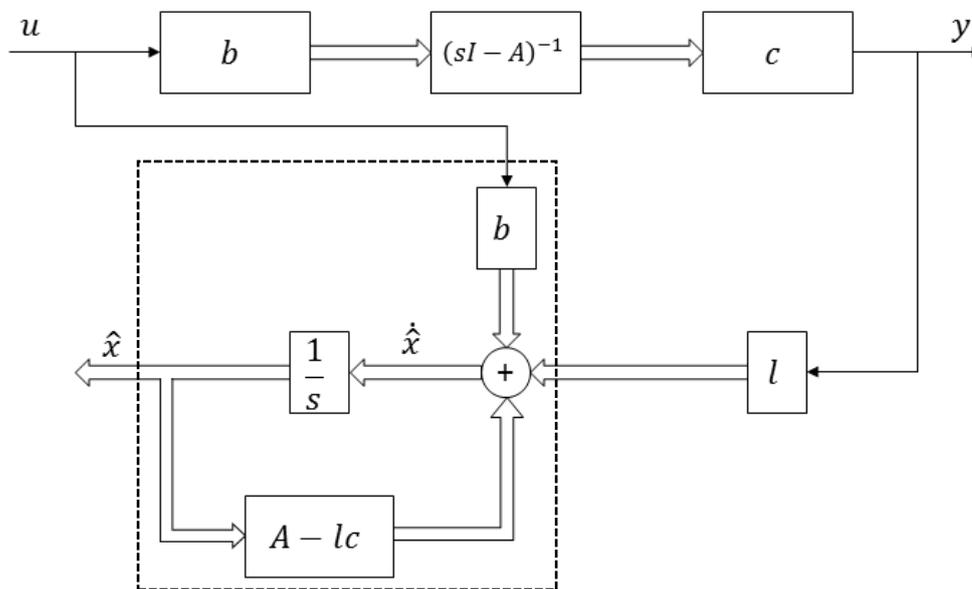


Figura adaptada de (Chen, 1999).

O índice utilizado foi um desvio médio da saída com relação à referência, calculado pela média da somatória do módulo dos erros. Os valores de MSME calculados para a Figura 4.6 estão apresentados na ordem que segue: a) $0,28^{\circ}\text{C}$, b) $0,95^{\circ}\text{C}$, c) $0,50^{\circ}\text{C}$, d) $0,51^{\circ}\text{C}$ foram resultados do controlador original, e) $0,15^{\circ}\text{C}$, f) $0,11^{\circ}\text{C}$, g) $0,20^{\circ}\text{C}$ e h) $0,30^{\circ}\text{C}$ foram os resultados do controlador auto ajustável. Portanto, para todos os casos o controlador preditivo auto ajustável apresentou melhor desempenho no acompanhamento da trajetória frente aos diferentes distúrbios provocados. Além disso, salienta-se que esse tipo de mecanismo de compensação pode ser bastante útil durante as fermentações, uma vez que a umidade do substrato não é medida durante o processo, o que pode gerar dinâmicas de crescimento distintas da prevista. Onde n é o número de amostras, T_{ref} é a temperatura de referencia no instante k e T_p é a temperatura média do processo no instante k .

Figura 4.6: Respostas do controlador preditivo para diversas condições de crescimento microbiano e referência de temperatura. Em (a), (b), (c) e (d) são mostrados os resultados do controlador preditivo original, enquanto em (e), (f), (g) e (h) são mostrados o do controlador adaptativo.

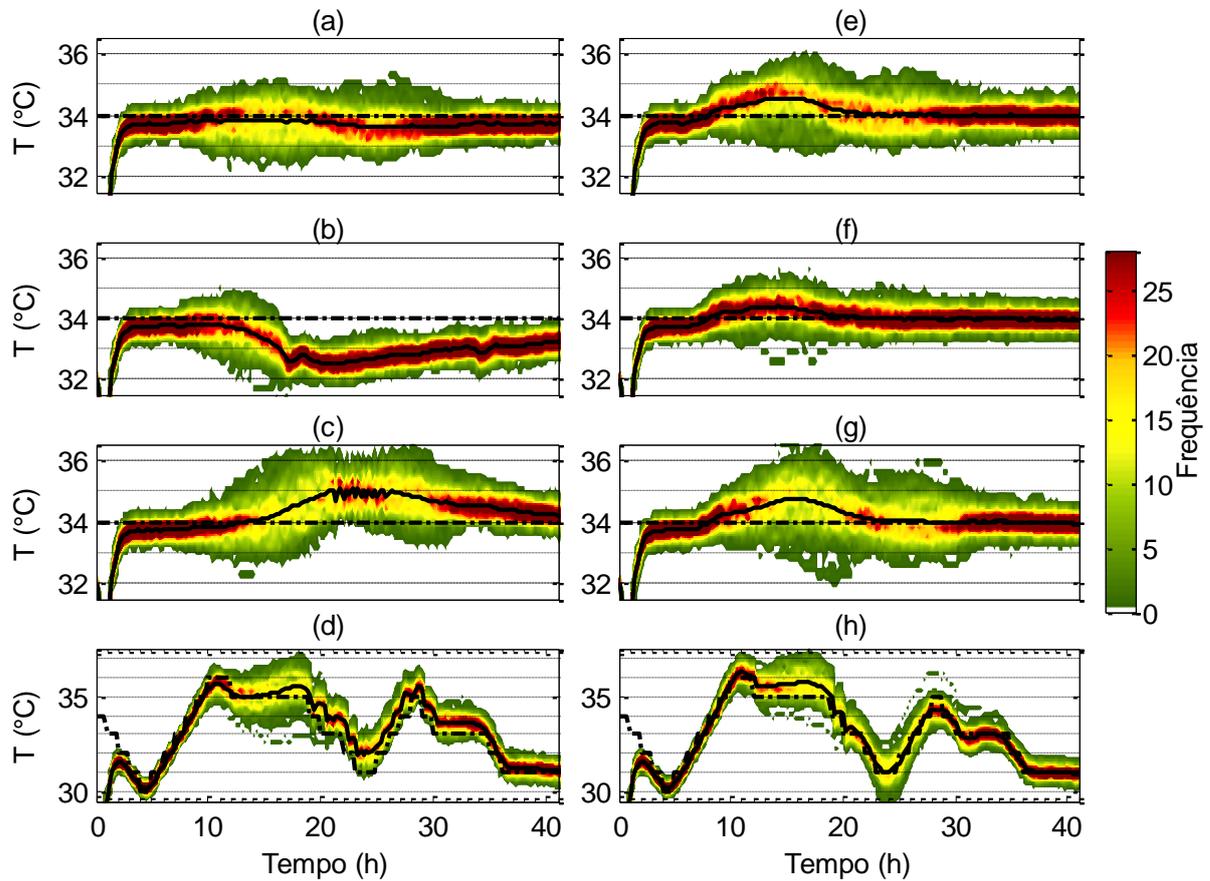


Figura elaborada pelo autor da tese.

4.5. RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO

A Figura 4.7 mostra os resultados de ambos controladores avaliados para os dois tipos de referências propostas, sendo que em (a) e (c) são as respostas do controlador PI, enquanto (b) e (d) são as do controlador preditivo. Observa-se que o controlador PI apresenta uma resposta transitória mais rápida do que a do preditivo. Isso, possivelmente, se deve à restrição imposta à ação do último, o que tornou o último mais conservador. Observa-se, principalmente para o controlador PI, que a resposta experimental apresenta características de um sistema superamortecido. Isso quer dizer que, as oscilações previstas durante as simulações são amortecidas no processo real, implicando na possibilidade de se utilizar um controlador com ações de controle mais acentuadas do que o atual. Por outro lado, ao se analisar as variações das ações desse controlador, é possível observar que as mesmas já possuem grande margem

para aumento nos ganhos do controlador. Esse fenômeno está relacionado com o ruído inerente ao processo, que faz com que o controlador altere sua saída bruscamente entre as amostras de temperatura. Os dados das ações de controle para ambos métodos são mostrados no material suplementar deste Capítulo. As diferenças existentes na temperatura inicial do processo estiveram relacionadas com a fase de secagem do substrato, na qual não foi possível garantir que a umidade final do substrato fosse sempre igual, conforme descrito no item 2.2. Como a temperatura de secagem do processo foi de cerca de 80°C, uma umidade maior implica em maior temperatura após a adição do meio de cultura e da água para atingir os 66% de umidade inicial requeridos. O percentual de água a ser adicionada foi estimado através da medida de massa de água residual do substrato lavado em uma balança de umidade.

Figura 4.7: Resultado experimental do controle da temperatura do meio fermentativo.

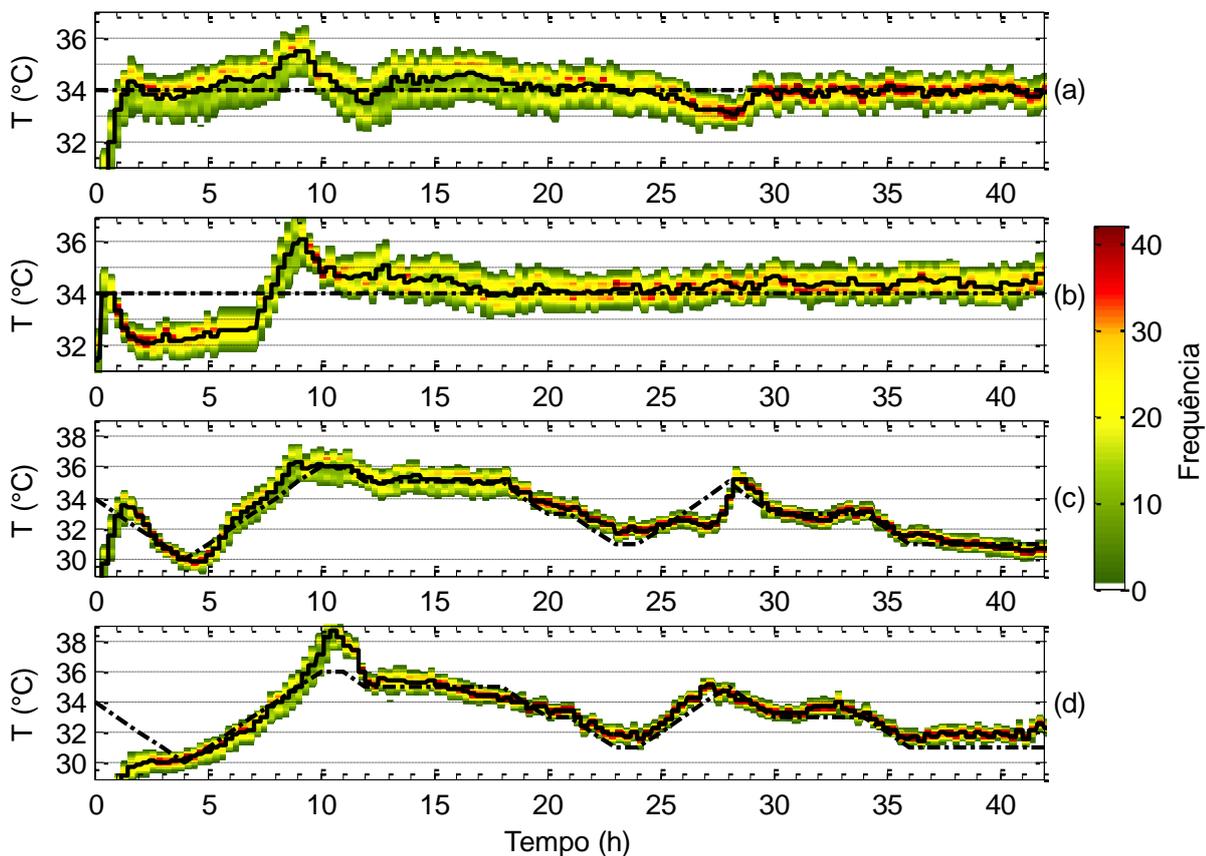


Figura elaborada pelo autor da tese.

Na Figura 4.7 (b), as condições iniciais da temperatura do processo foram diferentes daquelas encontradas nas demais, o que gerou uma solução de controle diferente daquelas observadas (a), (c) e (d). A natureza superamortecida do processo experimental é evidenciada tanto na Figura 4.7 (b) quanto em (d), nas quais a temperatura do processo demora mais do que o previsto para alcançar a referência. Ao se analisar os resultados das ações do controlador

preditivo, constata-se que é possível se aumentar o ganho do mesmo. Esses resultados são mostrados na Figura 4.8 (a) e (b) que mostram as ações de ambos controladores, respectivamente, para referência de temperatura constante e variável. É importante observar que, os valores de potência que são negativos foram estimados a partir da diferença de 3°C na observada temperatura da cuba entre quando o sistema de aquecimento/refrigeração está desligado e quando somente a refrigeração está ligada. Pela Equação (4.1), para diminuir ou aumenta 3°C na temperatura da cuba é necessário retirar ou colocar, respectivamente, aproximadamente 40 W, ou 142 kJ/h.

Figura 4.8: Ações de controle dos controladores Proporcional-Integrativo (PI) e Preditivo (Prd). Em (a) ações de controle para temperatura constante, em (b) para temperatura variável.

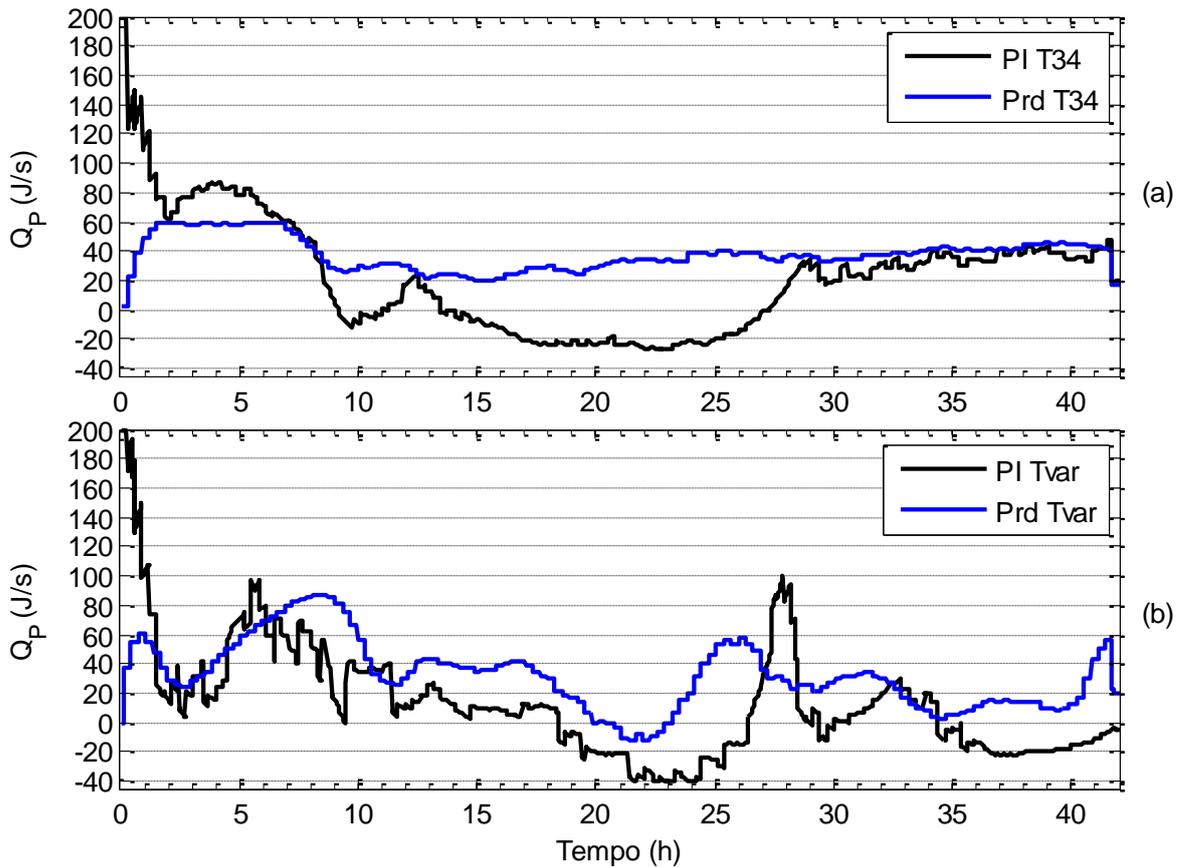


Figura elaborada pelo autor da tese.

Na Figura 4.7 (a) e (b), o pico de temperatura observado em torno de 10 horas do início do processo estão relacionados com o início da fase de crescimento exponencial. Esses picos não foram observados durante as simulações, pois possivelmente a velocidade prevista pelo modelo é menor do que a observada experimentalmente. Ressalta-se que o pico também está relacionado com o fenômeno da realimentação positiva, o que dificulta ainda mais a atuação do

controlador. Além disso, durante o início da fase de crescimento exponencial, o distúrbio se assemelha a um do tipo parabólico, o qual não é controlável por um controlador do tipo PI.

Considerando-se o regime permanente para a temperatura constante e para o acompanhamento da referência, ambos controladores possuem desempenho muito similar. Visto que as condições iniciais dos processos foram diferentes, foram consideradas apenas as medidas após 8 horas do início do processo. O controlador PI apresentou uma MSME de $0,34^{\circ}\text{C}$ para acompanhamento da referência constante e de $0,47^{\circ}\text{C}$ para referência variável. Já o controlador preditivo apresentou desvio médio de $0,44^{\circ}\text{C}$ para acompanhamento da referência constante e de $0,65^{\circ}\text{C}$ para referência variável.

O que realmente varia entre ambos são as ações de controle, principalmente quando as mesmas precisam ser inferiores a zero, o que implica que o ar interno está sendo trocado pelo externo da cuba. O controlador preditivo apresentou ações de controle muito mais suaves do que as do controlador PI, obtendo desempenho semelhante. As ações de controle mais intensas do controlador PI proporcionaram um transitório mais rápido para ambas as referências estudadas. Isso implica que o controlador preditivo ainda possui uma boa margem para aumento do seu ganho, resultando em períodos de transitório menores do que os atuais. Mesmo para o controlador PI ainda é possível aumentar o ganho proporcional, porém com margem menor do que a do preditivo.

Ao se considerar as margens para aumento de desempenho dos controladores, o controlador preditivo auto ajustável é melhor do que o controlador PI. Por outro lado, há que se levar em conta o tempo necessário para o desenvolvimento de cada controlador. Nesse caso, o controlador PI foi mais facilmente desenvolvido e implementado do que o preditivo, apresentou desempenho semelhante, porém menor margem de desenvolvimento/aprimoramento para um processo de FES.

4.6. CONCLUSÃO

Nesse capítulo foram desenvolvidos dois tipos de controladores para compensar a temperatura de um processo de FES frente aos distúrbios gerados pelo crescimento microbiano, atuando na temperatura da parede do biorreator, na agitação e na aeração do processo, simultaneamente. Tanto o controlador PI quanto o preditivo baseado em modelo apresentaram performances semelhantes em relação à minimização do erro entre a temperatura média do meio

fermentativo e a referência estabelecida. A grande vantagem que o controlador PI teve foram as facilidades em seu desenvolvimento e implementação. Já o controlador preditivo apresentou maior margem para aprimoramento de desempenho e aplicação como estimador de estados do processo.

Salienta-se que, o controlador baseado em modelo somente obteve maior margem para desenvolvimento após o uso do mecanismo de auto ajuste na estimação dos estados do processo. Para um processo biológico, com as incertezas na modelagem, não seria de esperar que um controlador preditivo zerasse o erro na temperatura do processo, já que suas estimativas possivelmente estariam erradas. Portanto, o estimador desenvolvido nesse trabalho é capaz de compensar incertezas nos mecanismos de crescimento e na umidade do meio, que são estados não medidos durante o processo. Variações no crescimento ainda podem ser compensadas alterando-se o parâmetro que simula a adaptação celular ao meio, permitindo que mesmo os picos do início da fase de crescimento exponencial sejam minimizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTROM, K. J.; HAGGLUND, T. The future of PID control. **Control Engineering Practice**, v. 9, n. 11, p. 1163-1175, Nov 2001. ISSN 0967-0661. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000172597300002 >.

ASTROM, K. J.; HAGGLUND, T. Revisiting the Ziegler-Nichols step response method for PID control. **Journal of Process Control**, v. 14, n. 6, p. 635-650, Aug 2004. ISSN 0959-1524. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000221249000005 >.

ASTROM, K. J.; PANAGOPOULOS, H.; HAGGLUND, T. Design of PI controllers based on non-convex optimization. **Automatica**, v. 34, n. 5, p. 585-601, May 1998. ISSN 0005-1098. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000074040800006 >.

BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C. Evolutionary operation as a tool of optimization for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 149-155, Mar 2003. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000180950500008 >.

BELLON-MAUREL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: A review. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 881-896, January 31 2003. ISSN 1359-5113. Disponível em: <<Go to ISI>://BIOABS:BACD200300121135 >.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The Fungi**. Academic Press, 2001. 588 p.

CHEN, C. T. **Linear System Theory and Design**. Oxford University Press, 1999. 334 p.

CHEN, H.; HE, Q. A novel structured bioreactor for solid-state fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 2, p. 223-230, Feb 2013. ISSN 1615-7591. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000314269900010 >.

COLEMAN, T. F.; LI, Y. Y. An interior trust region approach for nonlinear minimization subject to bounds. **Siam Journal on Optimization**, v. 6, n. 2, p. 418-445, May 1996. ISSN 1052-6234. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1996UL29000009 >.

COSTA, L.; OLIVEIRA, P. Evolutionary algorithms approach to the solution of mixed integer non-linear programming problems. **Computers & Chemical Engineering**, v. 25, n. 2-3, p. 257-266, Mar 15 2001. ISSN 0098-1354. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000167950000005 >.

COURI, S.; DEFARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Revista De Microbiologia**, v. 26, n. 4, p. 314-317, Oct-Dec 1995. ISSN 0001-3714. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1995UC48000013 >.

DALSENTER, F. et al. A mathematical model describing the effect of temperature variations on the kinetics of microbial growth in solid-state culture. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 801-807, FEB 2005 2005. ISSN 1359-5113.

DE CASTRO, A. M.; CASTILHO, L. R.; GUIMARES FREIRE, D. M. Multivariate Optimization and Supplementation Strategies for the Simultaneous Production of Amylases, Cellulases, Xylanases, and Proteases by *Aspergillus awamori* Under Solid-State Fermentation Conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 3, p. 1588-1602, Feb 2015. ISSN 0273-2289. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000349398800026 >.

DORF, R. C.; BISHOP, R. H. **Modern Control Systems**. Prentice Hall, 2006. 831 p.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 113-125, Mar 2003. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000180950500005 >.

EL-BAKRY, M. et al. From Wastes to High Value Added Products: Novel Aspects of SSF in the Production of Enzymes. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 18, p. 1999-2042, Sep 17 2015. ISSN 1064-3389. Disponível em: <<Go to ISI>://CCC:000356421300002 >.

FARINAS, C. et al. Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 1186-1192, JUL 2011 2011. ISSN 0926-6690.

FARINAS, C. S. et al. Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 1186-1192, Jul 2011. ISSN 0926-6690. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000293320100056 >.

GASIOREK, E. Effect of operating conditions on biomass growth during citric acid production by solid-state fermentation. **Chemical Papers**, v. 62, n. 2, p. 141-146, Apr 2008. ISSN 0366-6352. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000253753700003 >.

GELMI, C.; PEREZ-CORREA, R.; AGOSIN, E. Modelling *Gibberella fujikuroi* growth and GA(3) production in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 9, p. 1033-1040, Apr 2002. ISSN 1359-5113. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000174665200013 >.

HAMIDI-ESFAHANI, Z. et al. A two-phase kinetic model for fungal growth in solid-state cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36, n. 2, p. 100-107, Sep 2007. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000249671100005 >.

HAMIDI-ESFAHANI, Z.; SHOJAOSADATI, S.; RINZEMA, A. Modelling of simultaneous effect of moisture and temperature on *A-niger* growth in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, n. 3, p. 265-272, NOV 2004 2004. ISSN 1369-703X.

HE, Q.; CHEN, H. Pilot-Scale Gas Double-Dynamic Solid-State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 10, p. 2916-2924, Oct 2013. ISSN 1935-5130. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000323881800032 >.

HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175-186, Apr 2004. ISSN 0175-7598. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000220565100004 >.

KENNEDY, M.; KROUSE, D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 456-475, Dec 1999. ISSN 1367-5435. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000084919900002 >.

KUMAR, S. et al. Use of evolutionary operation (EVOP) factorial design technique to develop a bioprocess using grease waste as a substrate for lipase production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 7, p. 4909-4912, Apr 2011. ISSN 0960-8524. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000288637000046 >.

LEKANDA, J. S.; PEREZ-CORREA, J. R. Energy and water balances using kinetic modeling in a pilot-scale SSF bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1793-1802, Jul 2004. ISSN 1359-5113. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000223089500062 >.

LI, K. PID Tuning for Optimal Closed-Loop Performance With Specified Gain and Phase Margins. **Ieee Transactions on Control Systems Technology**, v. 21, n. 3, p. 1024-1030, May 2013. ISSN 1063-6536. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000318591000045 >.

LI, Y.; PENG, X.; CHEN, H. Comparative characterization of proteins secreted by *Neurospora sitophila* in solid-state and submerged fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 4, p. 493-498, Oct 2013. ISSN 1389-1723. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000326559500014 >.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959. ISSN 0003-2700. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1959WC85400035 >.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. **Solid-State Fermentation Bioreactors**. Springer-Verlag, 2006. 480p.

NAGEL, F. et al. Model for on-line moisture-content control during solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, n. 2, p. 231-243, Jan 20 2001a. ISSN 0006-3592. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000166233500011 >.

NAGEL, F. et al. Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, n. 2, p. 219-230, Jan 2001b. ISSN 0006-3592. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000166233500010 >.

OGATA, K. **Modern Control Engineering**. Prentice Hall, 1997. 997p.

PEREZ-CORREA, J. R.; FERNANDEZ-FERNANDEZ, M. Predictive controller evaluation including non-stationary high frequency noise and outliers for batch solid substrate fermentation bioreactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 29, n. 5-6, p. 399-407, Dec 2006. ISSN 1615-7591. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243261500012 >.

PIROTA, R. D. P. B.; BALEEIRO, F. C. F.; FARINAS, C. S. Saccharification of biomass using whole solid-state fermentation medium to avoid additional separation steps. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 6, p. 1430-1440, 2013. ISSN 1520-6033. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/btpr.1811> >.

RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. CULTURE METHOD TO STUDY FUNGAL GROWTH IN SOLID FERMENTATION. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 199-209, 1980 1980. ISSN 0340-2118.

RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, D. E. et al. The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10657-10662, 2011. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411012168> >.

SARGANTANIS, J. et al. EFFECT OF OPERATING-CONDITIONS ON SOLID SUBSTRATE FERMENTATION. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, n. 2, p. 149-158, Jun 1993. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993LD11000001 >.

SAUCEDO-CASTANEDA, G. et al. Heat-Transfer Simulation in Solid Substrate Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, n. 8, p. 802-808, Apr 1990. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1990CW04800007 >.

SAUCEDOCASTANEDA, G. et al. ONLINE AUTOMATED MONITORING AND CONTROL-SYSTEMS FOR CO₂ AND O₂ IN AEROBIC AND ANAEROBIC SOLID-STATE FERMENTATIONS. **Process Biochemistry**, v. 29, n. 1, p. 13-24, 1994 1994. ISSN 1359-5113.

SCHUTYSER, M. A. I. et al. Heat and water transfer in a rotating drum containing solid substrate particles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 5, p. 552-563, Jun 5 2003. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000182362300007 >.

SEBORG, D. E. et al. **Process Dynamics and Control**. 3 edition. Wiley, 2010. 528.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering**. Prentice Hall, 2002. 553.

SINGH, B.; KUMAR, R.; AHUJA, N. Optimizing drug delivery systems using systematic "Design of experiments." Part I: Fundamental aspects. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.

22, n. 1, p. 27-105, 2005 2005. ISSN 0743-4863. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000226954300002 >.

SKOGESTAD, S. Simple analytic rules for model reduction and PID controller tuning. **Journal of Process Control**, v. 13, n. 4, p. 291-309, Jun 2003. ISSN 0959-1524. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000181778400002 >.

SMITS, J. P. et al. The influence of temperature on kinetics in solid-state fermentation. v. 22, n. 1, p. 50–57, January 1998 1998. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00103-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00103-8)>.

STUART, D. M.; MITCHELL, D. A. Mathematical model of heat transfer during solid-state fermentation in well-mixed rotating drum bioreactors. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 78, n. 11, p. 1180-1192, Nov 2003. ISSN 0268-2575. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000185854700010 >.

STUART, D. M. et al. Solid-state fermentation in rotating drum bioreactors: Operating variables affect performance through their effects on transport phenomena. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, n. 4, p. 383-391, May 20 1999. ISSN 0006-3592. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000079313700001 >.

SUKUMPRASERTSRI, M. et al. Fuzzy Logic Control of Rotating Drum Bioreactor for Improved Production of Amylase and Protease Enzymes by *Aspergillus oryzae* in Solid-State Fermentation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 335-342, Mar 2013. ISSN 1017-7825. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000316919500008 >.

SZEWCZYK, K.; MYSZKA, L. THE EFFECT OF TEMPERATURE ON THE GROWTH OF ASPERGILLUS-NIGER IN SOLID-STATE FERMENTATION. **Bioprocess Engineering**, v. 10, n. 3, p. 123-126, MAR 1994 1994. ISSN 0178-515X.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146-161, Dec 15 2013. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000329772500018 >.

VAN DE LAGEMAAT, J.; PYLE, D. L. Solid-state fermentation: A continuous process for fungal tannase production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 87, n. 7, p. 924-929, Sep 30 2004. ISSN 0006-3592. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000223742700012 >.

VICCINI, G. et al. Analysis of growth kinetic profiles in solid-state fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 271-294, OCT-DEC 2001 2001. ISSN 1330-9862.

VON MEIEN, O. F. et al. Control strategies for intermittently mixed, forcefully aerated solid-state fermentation bioreactors based on the analysis of a distributed parameter model. **Chemical Engineering Science**, v. 59, n. 21, p. 4493-4504, Nov 2004. ISSN 0009-2509. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000224292700010 >.

VON MEIEN, O. F.; MITCHELL, D. A. A two-phase model for water and heat transfer within an intermittently-mixed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n. 4, p. 416-428, Aug 2002. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000177021400006 >.

WEBER, F. J.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. A simplified material and energy balance approach for process development and scale-up of *Coniothyrium minutans* conidia production by solid-state cultivation in a packed-bed reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 65, n. 4, p. 447-458, Nov 20 1999. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000083078500009 >.

WHAN SUNG, S.; LEE, J.; LEE, I.-B. **Process Identification and PID Control**. John Wiley & Sons, 2009.

5. CONCLUSÕES DA TESE

O primeiro objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo matemático para representar o crescimento microbiano em fermentação em estado sólido e sua produção de enzimas. Com o uso da metodologia utilizada, o modelo foi capaz de representar a dinâmica microbiana em uma ampla faixa de temperaturas, que variou entre 27°C e 43°C, e também de umidade inicial do substrato, de $1,5/1 \frac{m_a}{m_s}$ até $1,94/1 \frac{m_a}{m_s}$ (massa de água por massa de substrato seco). Além disso, o modelo foi capaz de representar os efeitos negativos do aumento da temperatura na viabilidade metabólica do microrganismo durante o processo. Esses resultados foram validados através de experimentos. A ampla faixa operacional modelada e a abordagem da ponderação na interpolação dos parâmetros conferem duas contribuições desse trabalho para a fermentação em estado sólido. Também, com esse modelo, não somente novos métodos de otimização do processo poderão ser empregados, mas também poderá ser utilizado no aprofundamento do conhecimento da dinâmica desse processo em biorreatores de maior porte.

O algoritmo de busca e otimização do processo baseado em modelo foi desenvolvido com o objetivo de se encontrar um perfil de temperaturas que pudesse aumentar a produção enzimática em um período curto de processo. Mas para aumentar a confiança da resposta deste, foi necessário desenvolver simultâneo do modelo do processo, o que se tornou uma rotina iterativa de aprimoramento da modelagem que pode ser empregada em outros estudos. Para a enzima estudada, o melhor perfil encontrado foi uma temperatura constante a 32°C. Esse algoritmo pode empregado a qualquer processo cuja modelagem tenha sido realizada em ampla faixa operacional, necessitando apenas rever o equacionamento e os parâmetros do modelo

Nesse trabalho, foi provada a eficiência dos controladores do tipo proporcionais-integrais. Na maioria dos artigos cujo objetivo é controle do processo de FES, nos quais o método de Ziegler-Nichols é aplicado, esses controladores são utilizados apenas como métodos de comparação. Foram quantificadas a estabilidade desse controlador, cujos parâmetros foram ajustados por diferentes métodos, incluindo o ZN, o qual não atendeu aos critérios de estabelecidos. O único momento em que o controlador não foi capaz de resolver o problema de controle foi durante a fase de aceleração do crescimento microbiano, cujo perfil de distúrbio se os controladores PI's não são capazes de lidar. Os resultados apresentados para esse controlador foram melhores do que qualquer outro encontrado na literatura, considerando-se o tanto o transiente inicial quanto o regime permanente.

O controlador preditivo, foi inicialmente desenvolvido com a modelagem realizada em colunas, apresentou desvios com relação à referência. Foi presumido que a causa desse resultado foi justamente a diferença entre as dinâmicas de crescimento em biorreatores de diferentes tipos. Para resolver esse problema, foi empregado um procedimento adaptativo para um dos parâmetros de crescimento microbiano. Essa solução, que além de novidade na área, permite a estimativa de diversos estados do processo, dependendo da instrumentação utilizada. O controlador preditivo apresentou um desempenho de controle semelhante ao do controlador PI. Porém, quando observadas as ações de cada controlador, o preditivo apresenta maior margem para desenvolvimento, pois apresentou amplitude de movimentação menor do que a do PI. Isso permite que a ponderação das ações de controle empregada durante o ajuste do mesmo seja diminuída, gerando ações de controle maiores e, conseqüentemente, menores tempos de transitório.

5.1. TRABALHOS FUTUROS

Como frentes que ainda podem ser aprimoradas desse trabalho, encontram-se os controladores. Conforme descrito, o uso de controladores em cascata pode contribuir para a obtenção de uma resposta mais precisa na temperatura do processo. Para tal, serão necessários novos estudos acerca das variáveis de saída do processo e a interação das mesmas com as variações medidas na temperatura. As análises de estabilidade relativa serão fundamentais para garantir a estabilidade desse tipo de malha de controle.

Considerando as variáveis de saída não medidas nesse trabalho, CO₂, temperatura e umidade relativa do ar, essas podem auxiliar nas estimativas de como deve atuar um controlador preditivo baseado em modelo. Mais ainda, poderão ser úteis na observação de estados que seriam dificilmente mensuráveis, tais como a biomassa ou a massa de substrato ainda presente. Essas medidas podem retornar a aumentar a precisão do balanço de massa de água do processo. O que por sua vez, melhoraria o acompanhamento da trajetória.

Por fim, a frente que pode ser a mais importante para a viabilização da FES em escala industrial é o estudo dos efeitos da agitação sobre a biomassa presente. Alguns estudos mostraram que agitações excessivamente elevadas levam a perdas na produtividade. Também mostraram que, sob as mesmas condições de agitação intensa, ao se utilizar a metade massa de substrato foi obtida uma maior produção que na condição nominal de massa de substrato para o biorreator utilizado (Stuart *et al.*, 1999). Essas considerações mostram que não é somente

velocidade de movimentação das pás estão associadas às perdas, mas também a energia imposta pelo movimento das pás na massa deslocada.

Estudos futuros podem ser realizados em diferentes escalas de biorreatores de tambor agitado, com diferentes massas de substrato e agitações relacionados à energia cinética de tal movimento. O controlador preditivo com estimador auto ajustável poderá colaborar com as estimativas do crescimento da biomassa, devendo ainda serem considerada a produção de enzimas.

6. CONSIDERAÇÕES PESSOAIS

O início dessas considerações se dá com uma demonstração realizada na disciplina SMA-304 Álgebra Linear do ICMC/USP. Essa dizia: prove que $0 + 0 = 0$. O principal aspecto dessa afirmação era demonstrar a existência de um elemento neutro em qualquer adição. Isso quer dizer, parte-se de uma hipótese: existe um elemento que não altera nenhuma característica do sistema em que atua. Mais do que isso, é necessário provar que essa hipótese é verdadeira através do uso correto das propriedades do sistema matemático. A propriedade que prova isso é a propriedade comutativa. Assim, se existir algum outro elemento $0'$, que seja neutro e pertencente ao mesmo espaço vetorial de 0 , a prova é simples: $0' = 0 + 0' = 0' + 0 = 0$. De maneira geral, a prova mencionada anteriormente tem por implicação a de criação um caminho que possibilita validar uma determinada hipótese, por mais simples que seja.

Com o pensamento de que foi possível levantar uma hipótese, fez-se necessário prová-la. Foi exatamente essa a intenção do capítulo sobre modelagem e otimização do processo, no qual foi admitida a hipótese de que existia um caminho para o perfil de temperaturas que levaria à uma produção maior de enzimas do que com o processo em temperatura constante. Para se alcançar tal objetivo, foi necessário aplicar e desenvolver um modelo matemático para o processo fermentativo. Aplicar e desenvolver um método de otimização para procurar um possível perfil de temperaturas para cada momento do processo que trouxesse uma melhora no desempenho do processo.

A demonstração da existência ou não de tal hipótese passou primeiramente pelo aprofundamento do conhecimento do processo, cuja qualidade da modelagem foi melhorada a cada rodada de avaliação dessa. O fator estatístico não foi excluído desse processo, mas esteve presente apenas como elemento determinante do intervalo de confiança das soluções obtidas. No início do procedimento de modelagem e otimização do processo, os resultados pareciam promissores. Contudo, uma vez aperfeiçoados o modelo e o procedimento de otimização dos perfis de temperatura, observou-se que o melhor perfil de temperaturas era uma constante a 32°C , contrariando a hipótese feita.

Mesmo que a hipótese não tenha sido comprovada, o caminho realizado para a demonstração da mesma implica em um ganho para a modelagem do processo, visto que a mesma é capaz de descrever o desenvolvimento microbiano não somente em diversas condições ambientais, mas também, o efeito das variações dessas nos mecanismos de crescimento. Por

consequência, também na produção de enzimas. Desse modo, o pensamento algébrico matemático pode auxiliar no desenvolvimento do processo de fermentação em estado sólido.

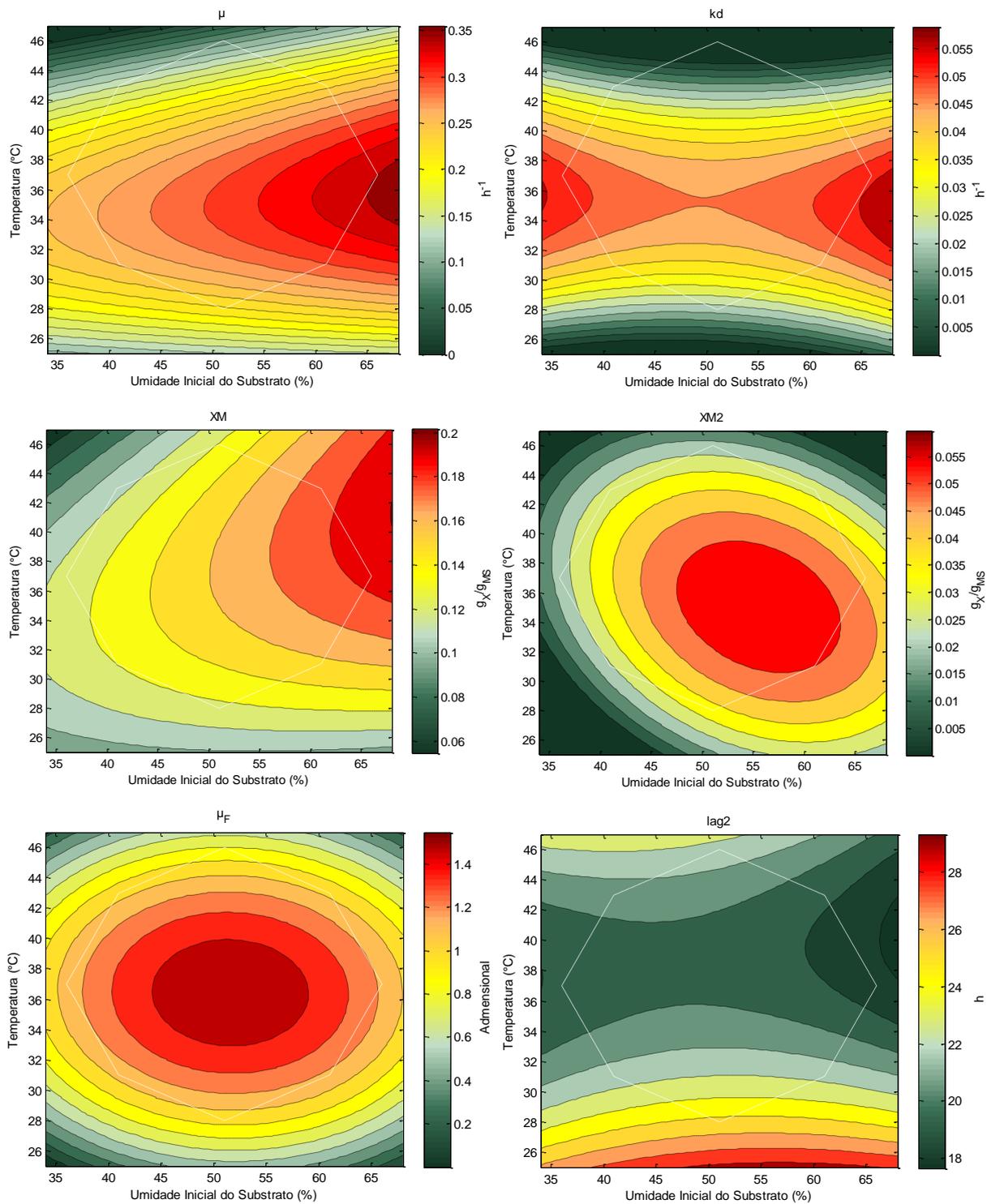
APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR DA MODELAGEM DO PROCESSO

Na Figura A.1, são mostradas as superfícies interpoladas para cada um dos parâmetros do modelo de crescimento microbiano. Para o crescimento específico (μ), a superfície é similar ao que é previsto na literatura (Mitchell *et al.*, 2006), onde se espera uma superfície de 2° grau ou de 4° grau com concavidade para baixo. Não foram realizados experimentos em condições com maior umidade inicial do substrato, pois o mesmo já se encontra no limiar da saturação. Dito isto, pode-se considerar que os valores de crescimento específico diminuiriam rapidamente com o aumento da umidade inicial do substrato, assemelhando-se ao previsto na literatura.

A velocidade de morte/desativação celular não acompanha a prevista na literatura, em que seriam previstos valores maiores conforme aumenta-se a temperatura. Foi realizado um experimento a 46°C e 51% de umidade inicial do substrato, porém não foi possível calcular os parâmetros, uma vez que não foi observado nenhum crescimento celular. Pode-se considerar nesse caso que o valor de k_d é maior do que o valor de μ , porém a falta de dados em outras condições de umidade não permite uma extrapolação de tais valores com confiança.

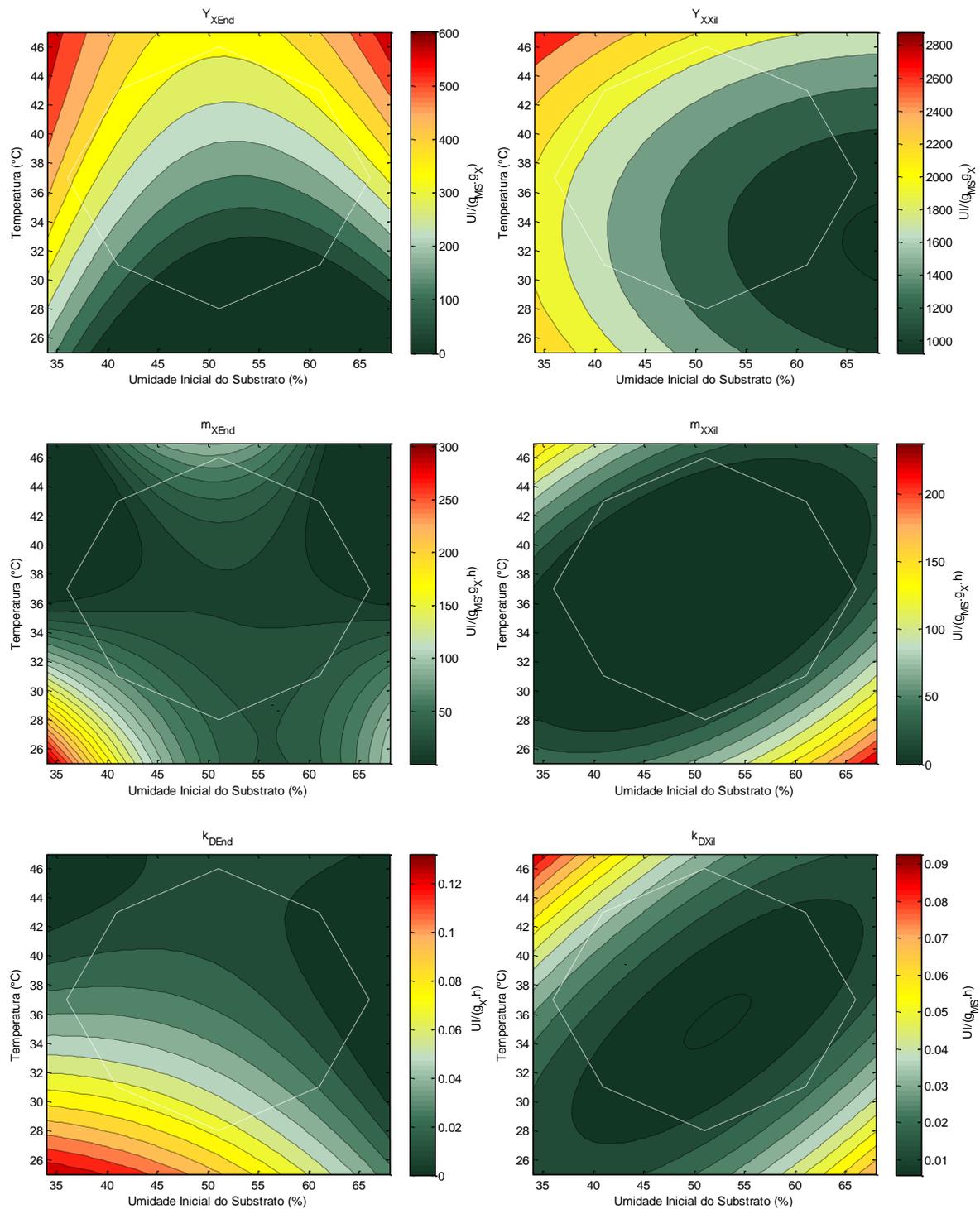
Já para os valores de máxima formação de biomassa por massa seca, nota-se que temperaturas mais altas (40°C) favorecem o crescimento primário, enquanto temperaturas menores (32°C) o crescimento secundário. Fica claro com isso que a temperatura influencia significativamente nos mecanismos de crescimento microbiano. Esse comportamento se torna mais claro ao se observar a velocidade de adaptação do microrganismo ao meio e o tempo de início da segunda fase de crescimento. Quanto menor a temperatura, mais tempo o fungo demora para crescer. Já ao contrário, para temperaturas mais elevadas, a tendência é que todo o metabolismo seja acelerado. Seria esperado com esse comportamento, que a formação de produtos relacionados com o crescimento seja maior em temperaturas maiores e para o caso de produtos não relacionados com o crescimento, maiores em temperaturas menores. Essa questão poderá ser aprofundada em trabalhos futuros, através da realização de experimentos e simulação do processo.

Figura A.1: Curvas de nível da interpolação polinomial quadrática para os parâmetros da Tabela 3.



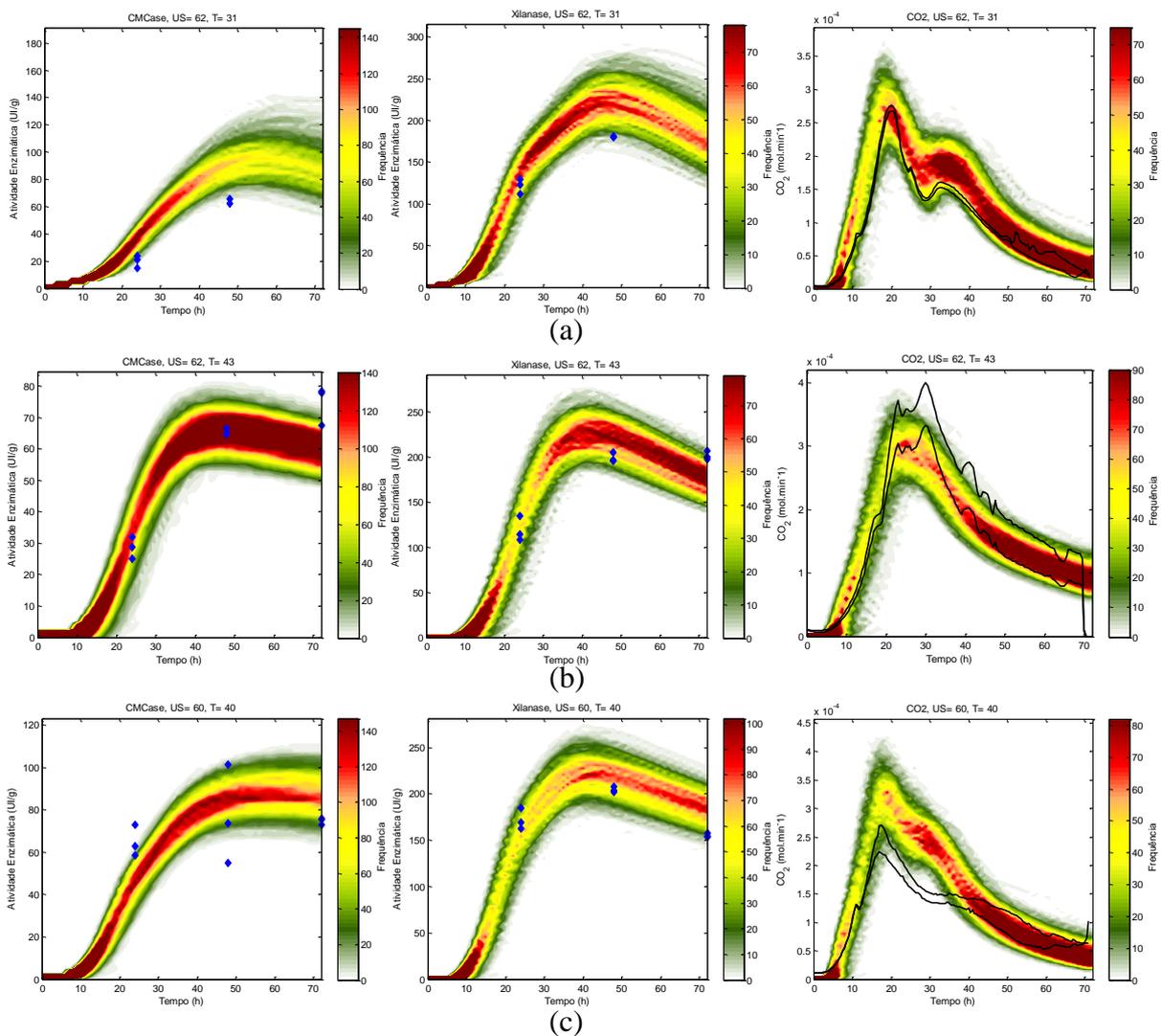
Analisando as curvas da Figura A.2, é possível observar que ao se aumentar a temperatura do processo, a formação de produtos se torna mais associada aos processos crescimento celular, enquanto a diminuição da mesma acarreta uma não associação da formação dos produtos ao crescimento celular. Pode-se entender que isso ocorre devido à diminuição da velocidade de crescimento e, uma vez que o substrato também é consumido mais lentamente, o microrganismo dedica a formação de produtos a outros processos e não o crescimento.

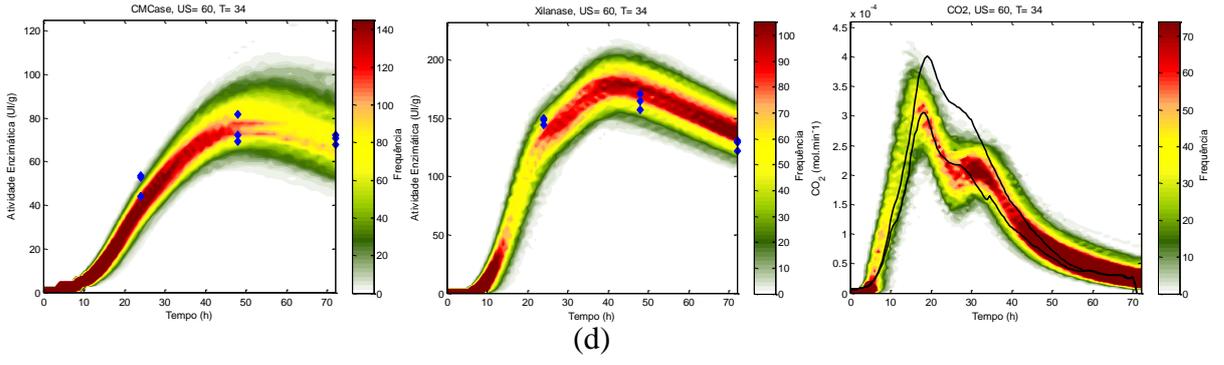
Figura A.2: Curvas de nível da interpolação polinomial quadrática para os parâmetros da Tabela 4.



Observa-se na Figura A.3 que o modelo foi capaz de representar adequadamente o processo em diversas condições operacionais. No entanto, salienta-se que a ponderação utilizada visou uma melhor descrição do processo em condições cuja umidade inicial do substrato era de 66%. Por esse motivo, o crescimento microbiano não foi preciso em todas as condições operacionais. A mesma consideração é válida para a formação das enzimas, que, por outro lado, foram representadas com maior precisão nas condições operacionais da figura.

Figura A.3: Comparação entre a resposta experimental e a resposta do modelo (com intervalo de confiança) das enzimas CMCase, xilanase e do CO_2 , nas condições: (a) $\text{USI}=62\%$ e $T=31^\circ\text{C}$, (b) $\text{USI}=62\%$ e $T=43^\circ\text{C}$, (c) $\text{USI}=60\%$ e $T=40^\circ\text{C}$ e (d) $\text{USI}=60\%$ e $T=34^\circ\text{C}$.

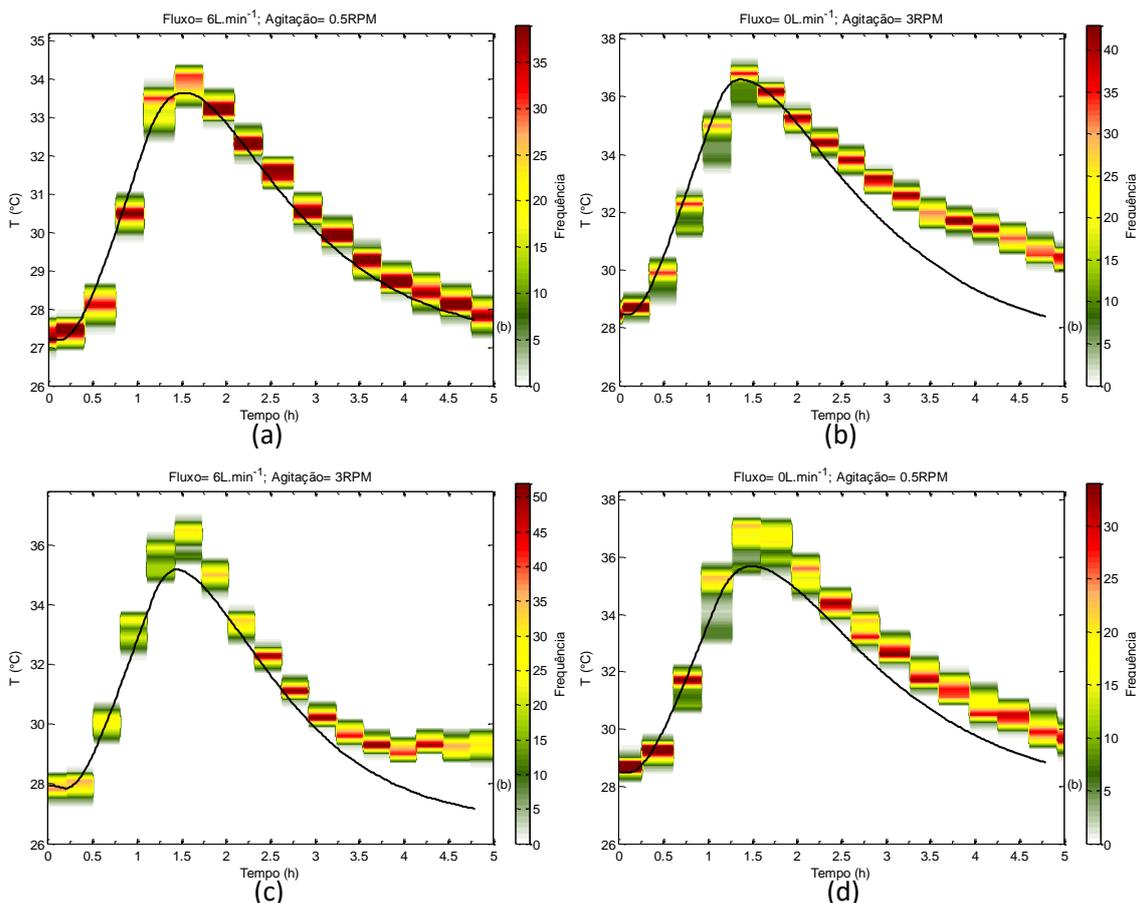


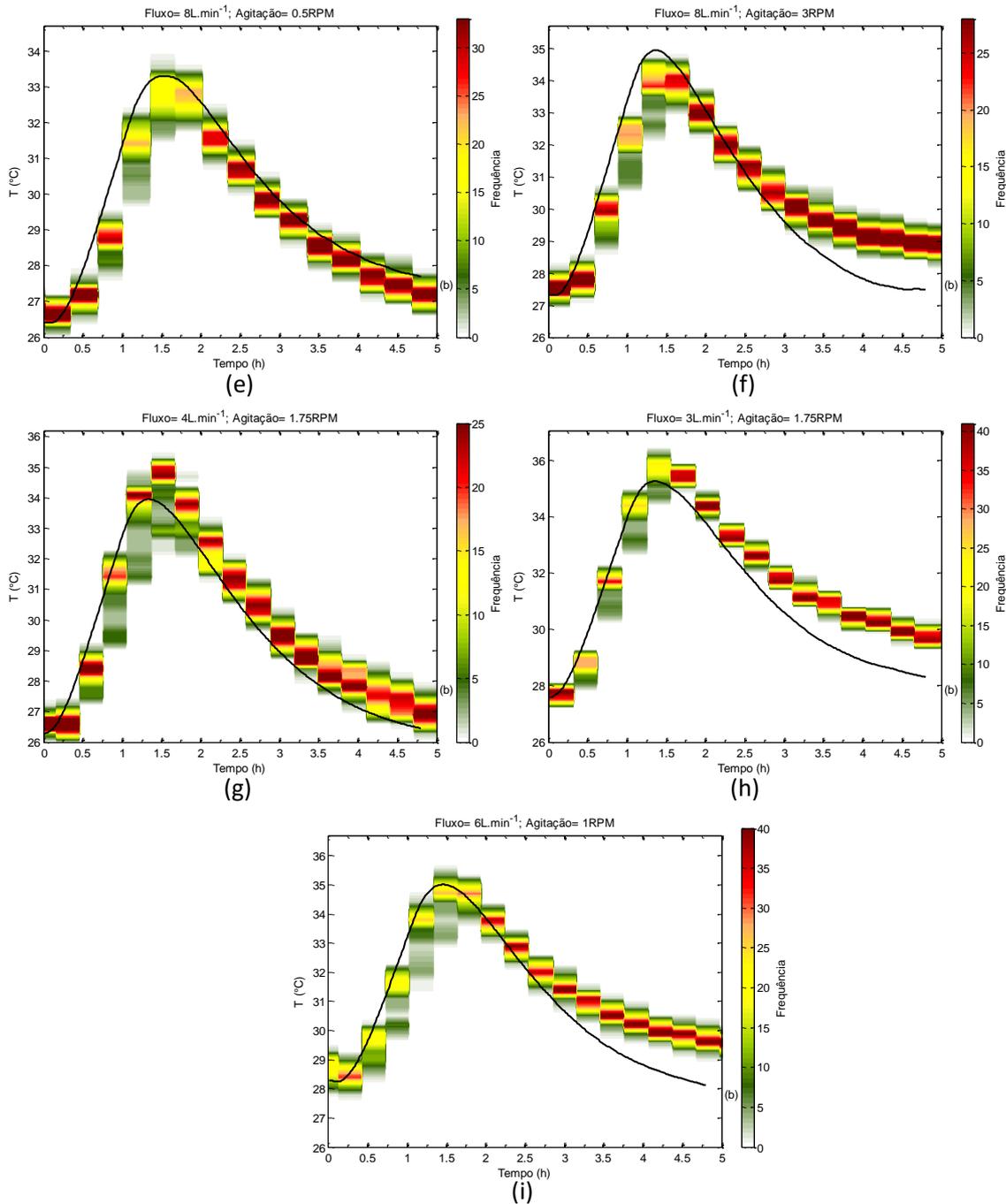


APÊNDICE B – MATERIAL SUPLEMENTAR DO CONTROLE DO PROCESSO

A Figura B.1 mostra o resultado do ajuste dos parâmetros do modelo assumido para o biorreator desenvolvido, Equações (4.1) a (4.4). Os parâmetros foram ajustados para cada uma das Figuras apresentadas e posteriormente interpolados por uma superfície polinomial de 1º grau. As diferenças observadas entre o resultado do modelo e o experimental são devidas a distúrbios não modelados na cuba de aquecimento do biorreator. Observa-se que, descontados os distúrbios, o modelo se apresentou preciso o suficiente para representar o processo de aquecimento do meio fermentativo, considerando que foi requisito dos controladores desenvolvidos serem robustos às imprecisões do modelo.

Figura B.1: Comparação entre a resposta do modelo de transferência de calor do meio fermentativo e a resposta experimental. As condições experimentais foram: (a) Fluxo de 6L/min e agitação de 0,5 RPM; (b) Fluxo de 0L/min e agitação de 3,0 RPM; (c) Fluxo de 6L/min e agitação de 3,0 RPM; (d) Fluxo de 0L/min e agitação de 0,5 RPM; (e) Fluxo de 8L/min e agitação de 0,5 RPM; (f) Fluxo de 8L/min e agitação de 3,0 RPM; (g) Fluxo de 4L/min e agitação de 1,75 RPM; (h) Fluxo de 3L/min e agitação de 1,75 RPM; (i) Fluxo de 6L/min e agitação de 1,0 RPM. A barra de cores lateral da cada figura indica o número de ocorrências observadas em cada conjunto de amostras.





A Figura B.2 apresenta algumas respostas do procedimento de ajuste das ponderações das ações de controle. No caso, quanto menor f , maior será a amplitude das ações do controlador, e menor será o tempo de transiente no início do processo. Por outro lado, como pode ser visto na Figura B.3, um controlador muito rápido pode gerar instabilidade no processo, dado o número de oscilações observadas para $f=0$ em ambas as referências avaliadas. Na Figura B.4 são apresentadas as ações do controlador Proporcional-Integral ajustado por diferentes métodos. Observa-se em todos os casos que esse controlador apresenta maiores oscilações do que o preditivo. Considera-se com isso que a margem para aprimoramento do controlador preditivo é maior do que a do controlador PI. Contudo, conforme é visto na Figura B.5, quando

comparado com a Figura 4.6, o controlador PI lida facilmente com variações no processo fermentativo, como foi o caso do máximo crescimento. Já para o controlador preditivo, foi necessário desenvolver um mecanismo adaptativo para resolver o mesmo problema.

Na Figura B.6 é apresentada a distribuição espacial da temperatura no interior do biorreator em função do tempo. A cada 15 minutos foram colhidas noventa amostras ao longo do percurso da sonda de temperatura, sendo que as medidas são tomadas na sequência numérica apresentada nas figuras. Observa-se que as temperaturas são menores na parte do biorreator que fica em contato com a abertura da cuba que acomoda a sonda, e que a temperatura é um pouco maior na parte central do biorreator. Esse efeito possivelmente se deve ao fato do aquecedor ficar localizado na parte central da cuba, com fluxo de ar quente sendo direcionado para baixo e no centro do biorreator. Esse tipo de efeito pode ser minimizado através de uma jaqueta térmica ou mesmo através de um conjunto de pás agitadoras mais eficientes do que as atuais.

Figura B.2: Respostas do controlador preditivo para diferentes ponderações das ações de controle. Em (a) e (e) tem-se $f=0$, em (b) e (f) $f=0,012$, em (c) e (g) $f=0,1$ e em (d) e (h) $f=0,5$.

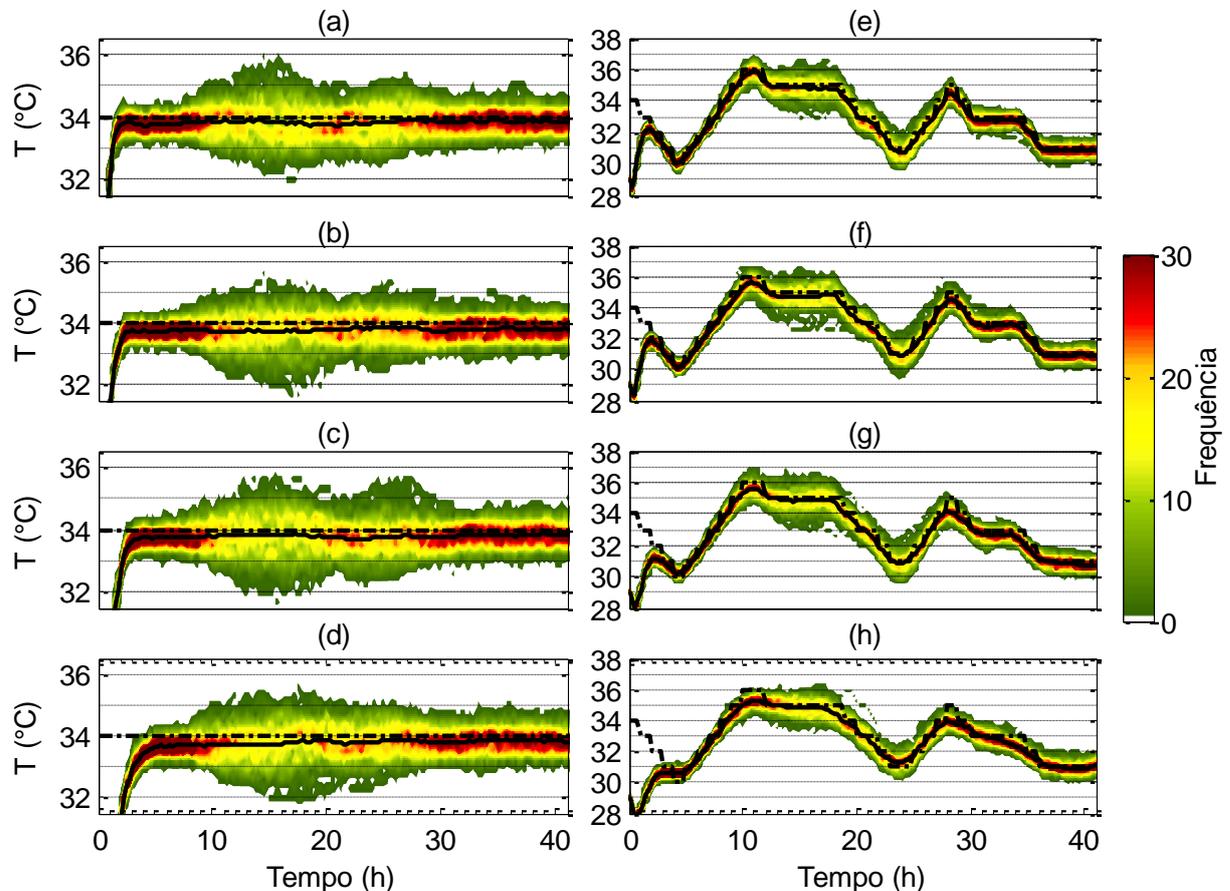


Figura B.3: Simulação das ações do controlador preditivo para diferentes ponderações das ações de controle. Em (a) são mostradas as respostas para referência constante e em (b) para referência de temperatura variante no tempo.

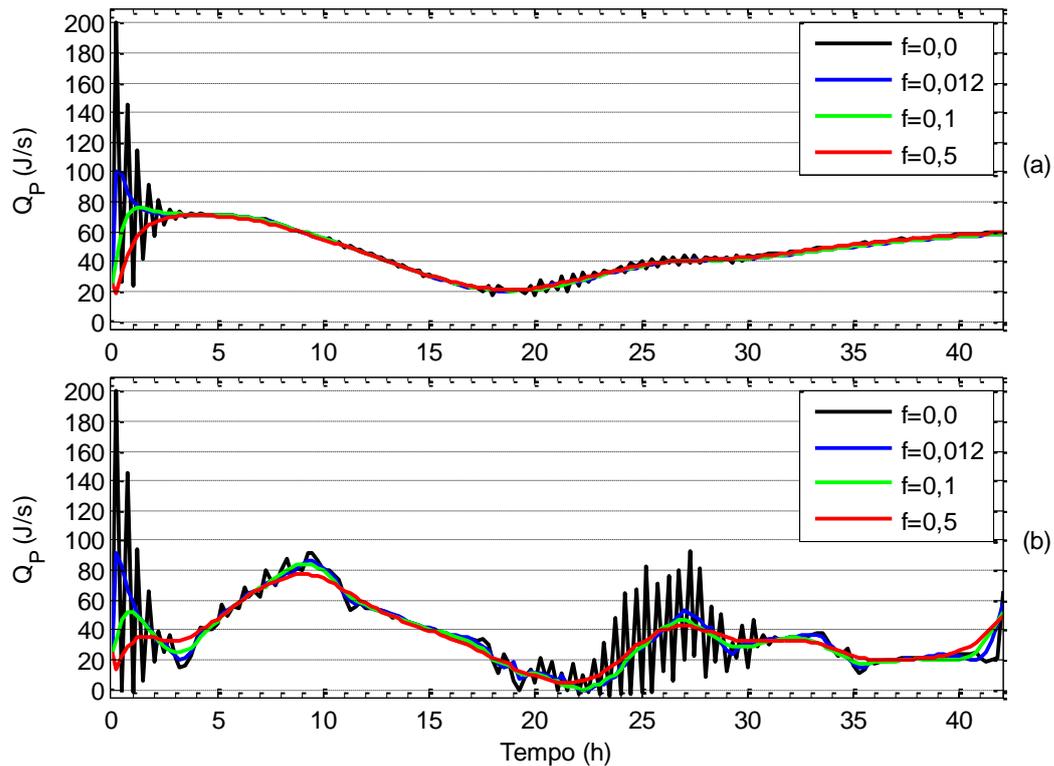


Figura B.4: Simulação das ações do controlador PI para diferentes metodologias de ajuste de parâmetros. Em (a) são mostradas as respostas para referência constante e em (b) para referência de temperatura variante no tempo.

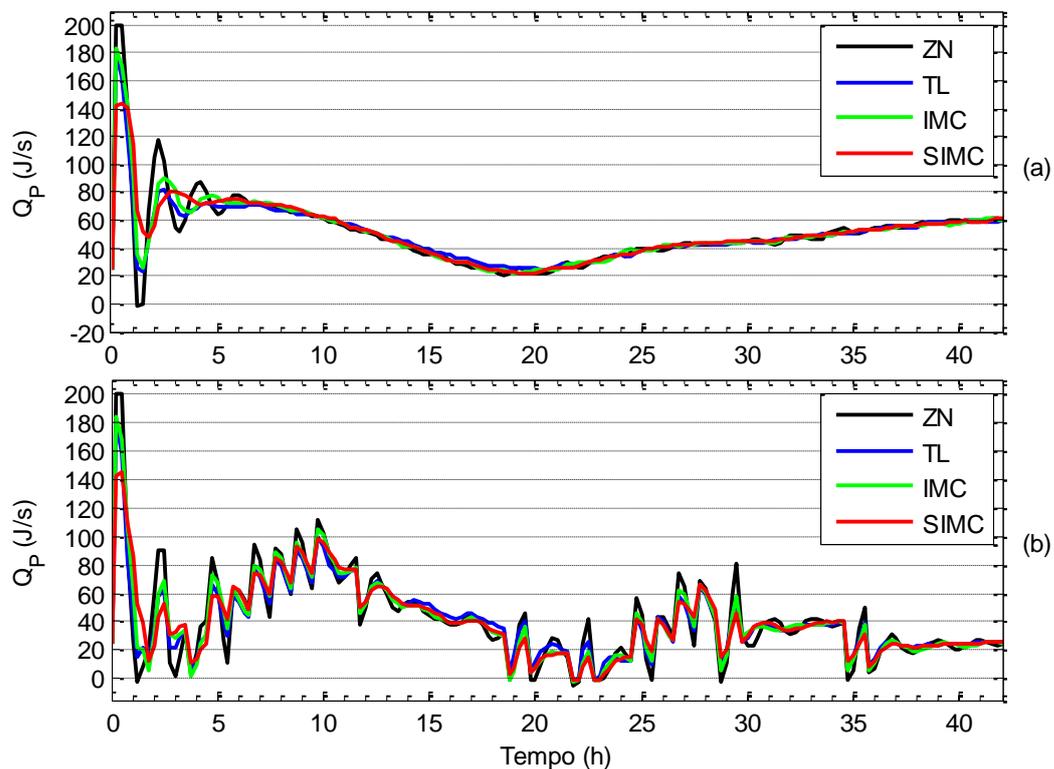


Figura B.5: Respostas do controlador PI ajustado pela metodologia SIMC para diversas condições de crescimento microbiano e referência de temperatura. Em (a) e (e) sem variações para X_M , (b) e (f), foi admitido um crescimento máximo maior do que nas colunas (130% de X_M), em (c) e (g) um crescimento máximo menor (70% de X_M) e em (d) e (h) 70% de X_M para $t \geq 15$ horas e 130% de X_M para $t \geq 15$ horas.

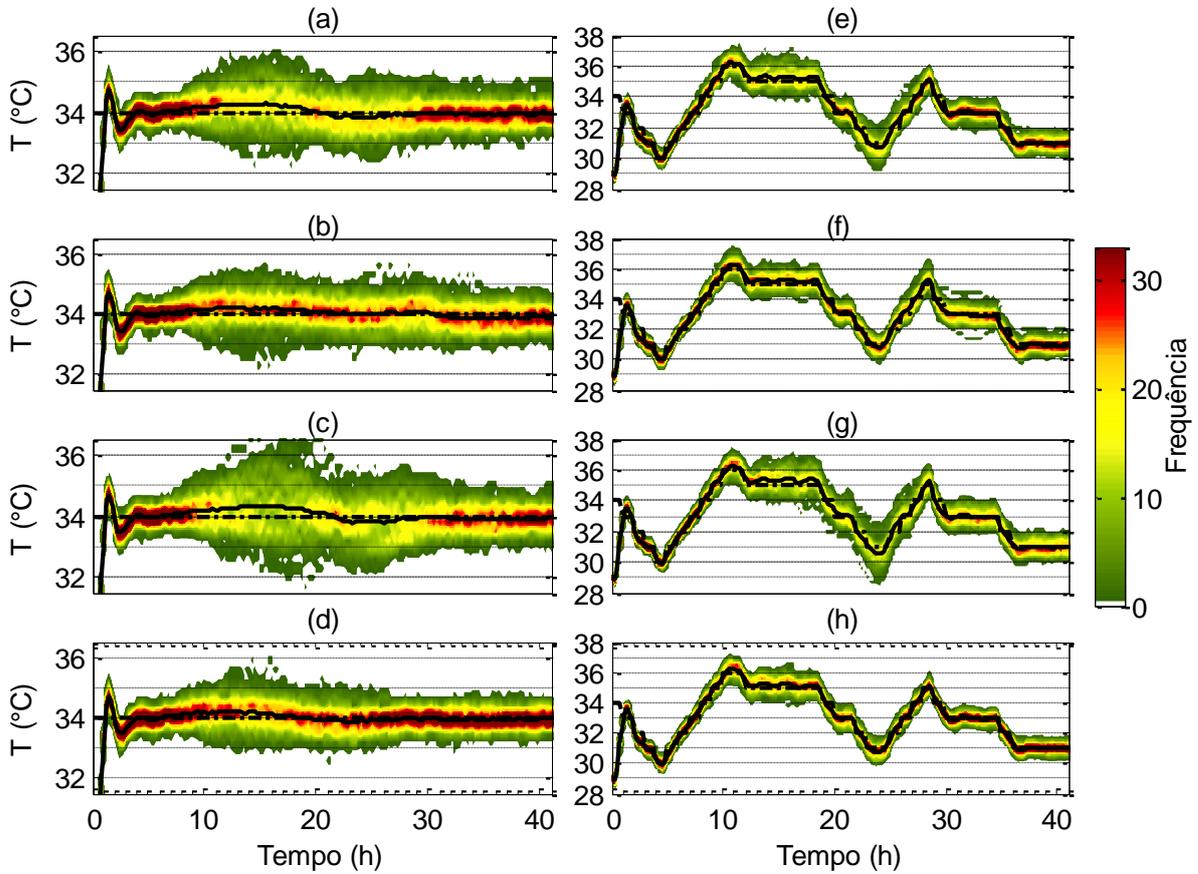


Figura B.6: Gráficos da dispersão da temperatura no interior do biorreator para as diferentes referências/metodologias utilizadas. Em (a) controlador PI a 34°C, em (b) preditivo a 34°C, em (c) PI acompanhando o perfil de temperaturas 3 e em (d) o preditivo acompanhando o perfil.

